



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C07K 16/28, 16/46, C12N 5/16, 15/06, G01N 33/577, A61K 39/395</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/40118</p> <p>(43) 国際公開日 1999年8月12日(12.08.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/00478</p> <p>(22) 国際出願日 1999年2月4日(04.02.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/23388 1998年2月4日(04.02.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 協和 酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)[JP/JP] 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 設楽研也(SHITARA, Kenya)[JP/JP] 〒251-0025 神奈川県藤沢市鵠沼石上2-1-19 Kanagawa, (JP) 伊東幹人(ITO, Mikito)[JP/JP] 〒194-0023 東京都町田市旭町3-6-6 Tokyo, (JP) 花井陳雄(HANAI, Nobuo)[JP/JP] 〒229-0011 神奈川県相模原市大野台7-9-15 Kanagawa, (JP) 新海暁男(SHINKAI, Akeo)[JP/JP] 〒194-0021 東京都町田市中町3-9-11 Tokyo, (JP)</p>		<p>穴澤秀治(ANAZAWA, Hideharu)[JP/JP] 〒178-0064 東京都練馬区南大泉4-19-18 Tokyo, (JP) 澁谷正史(SHIBUYA, Masabumi)[JP/JP] 〒336-0866 埼玉県川口市芝5374-18-601 Saitama, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, BG, BR, CA, CN, CZ, HU, IL, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, UA, US, VN, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書 明細書とは別に規則 13 の 2 に基づいて提出された生物材料 の寄託に関する表示"</p>
<p>(54)Title: ANTIBODIES AGAINST HUMAN VEGF RECEPTOR KDR</p> <p>(54)発明の名称 ヒトVEGF受容体KDRに対する抗体</p> <p>(57) Abstract</p> <p>An antibody reacting with human VEGF receptor KDR but not with human VEGF receptor Flt-1; an antibody binding to human VEGF receptor KDR and preventing human VEGF from binding to the human VEGF receptor KDR to thereby neutralize the effect of KDR; and methods with the use of these monoclonal antibodies in diagnosing and treating diseases which advance with abnormal neovascularization, for example, proliferation of solid tumor, metastasis, arthritis in chronic rheumatoid arthritis, diabetic retinopathy, premature infant retinopathy, psoriasis, etc.</p>		

(57)要約

本発明は、ヒト VEGF 受容体 KDR に反応し、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 には反応しない抗体に関する。ヒト VEGF 受容体 KDR に結合し、ヒト VEGF のヒト VEGF 受容体 KDR への結合を阻害して KDR の作用を中和する抗体に関する。さらに、該モノクローナル抗体を用いた固形腫瘍の増殖、転移形成、慢性関節リウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、乾癬など異常な血管新生により病態が進行する疾患の診断および治療方法に関する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SG シンガポール
AL アルバニア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SI スロヴェニア
AM アルメニア	FR フランス	LR リベリア	SK スロヴァキア
AT オーストリア	GA ガボン	LS レソト	SL シエラ・レオネ
AU オーストラリア	GB 英国	LT リトアニア	SN セネガル
AZ アゼルバイジャン	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SZ スワジランド
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE グルジア	LV ラトヴィア	TD チャード
BB バルバドス	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴ
BE ベルギー	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BF ブルキナ・ファソ	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BG ブルガリア	GW ギニア・ビサウ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BJ ベナン	GR ギリシャ	共和国	TT トリニダード・トバゴ
BR ブラジル	HR クロアチア	マリ	UA ウクライナ
BY ベラルーシ	HU ハンガリー	ML モンゴル	UG ウガンダ
CA カナダ	ID インドネシア	MN モーリタニア	US 米国
CF 中央アフリカ	IE アイルランド	MW マラウイ	UZ ウズベキスタン
CG コンゴ	IL イスラエル	MX メキシコ	VN ヴィエトナム
CH スイス	IN インド	NE ニジェール	YU ユーゴスラビア
CI コートジボアール	IS アイスランド	NL オランダ	ZA 南アフリカ共和国
CM カメルーン	IT イタリア	NO ノールウェー	ZW ジンバブエ
CN 中国	JP 日本	NZ ニュー・ジーランド	
CU キューバ	KE ケニア	PL ポーランド	
CY キプロス	KG キルギスタン	PT ポルトガル	
CZ チェコ	KP 北朝鮮	RO ルーマニア	
DE ドイツ	KR 韓国	RU ロシア	
DK デンマーク	KZ カザフスタン	SE スウェーデン	
EE エストニア	LC セントルシア		

## 明 細 書

### ヒト VEGF 受容体 KDR に対する抗体

#### 技術分野

本発明は、固形腫瘍の増殖、転移形成、慢性関節リュウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、乾癬など異常な血管新生により病態が進行する疾患の診断あるいは治療に有用な、ヒト VEGF 受容体 KDR に特異的に結合する抗体、該抗体を生産するハイブリドーマあるいは形質転換体、および該抗体を用いてヒト VEGF 受容体 KDR を免疫学的に検出する方法、並びに該抗体を用いる固形腫瘍、慢性関節リュウマチ、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、乾癬などの診断法、治療法に関する。

#### 背景技術

血管新生は、脊椎動物の胎生期における循環器系の形成や多くの組織の構築に重要な役割を果たすとともに、成熟個体（雌）においても性周期における黄体形成、子宮内膜の一過性の増殖、胎盤形成などに密接に関与する。さらに、病的状態としては、固形腫瘍の増殖、転移形成、糖尿病性網膜症、慢性関節リュウマチの病態形成、促進に血管新生が深く関与している（J.Folkman ら；J. Biol. Chem., 267, 10931, 1992）。血管新生は、血管新生因子が分泌されることが引き金となり、近傍にある既存の血管の内皮細胞からプロテアーゼが分泌され、基底膜、間質が破壊され、続いて血管内皮細胞の遊走、増殖がはじまり、管腔が形成されることで血管が新生される過程よりなる（J.Folkman ら；J. Biol. Chem., 267, 10931, 1992）。血管新生を誘導する因子としては、Vascular permeability factor (VPF)/Vascular endothelial growth factor (VEGF)が上記発生段階における血管新生および病的な状態における血管新生において最も重要な因子として知られている（M.Shibuya; Advances in Cancer Research 67, 281, 1995.）。VPF/VEGF はホモダイマーよりなる分子量約 4 万のタンパクであり、1983 年に血管透過性促進因子(Vascular permeability factor: VPF)として（D.R.Senger ら；Science 219, 983,

1983.)、1989年に血管内皮細胞増殖因子(Vascular endothelial growth factor: VEGF)として独立した分子として報告されたが(N.Ferrara ら; Biochem. Biophys. Res. Comm., 161, 851, 1989.)、cDNA クローニングの結果、両者は同一の物質であることが明らかとなった(D.W.Leung ら; Science, 246, 1306, 1989; P.J.Keck ら; Science, 246, 1309, 1989.) (以下 VEGF と記載)。VEGF の活性としてはこれまでに、血管内皮細胞に対し、増殖促進活性(ED50 = 2-3 pM) (N.Ferrara ら; Biochem. Biophys. Res. Comm., 161, 851, 1989.)、遊走促進活性 (A.E.Koch ら; J. Immunology, 152, 4149, 1994.)、メタロプロテアーゼ分泌促進活性 (E.N.Unemori ら; J. Cell Physiol., 153, 557, 1992.)、ウロキナーゼ、tPA 分泌促進活性 (M.S.Pepper ら; Biochem. Biophys. Res. Comm., 181, 902, 1991.)を示し、in vivo においては血管新生促進活性 (T.Asahara ら; Circulation, 92 suppl II, 365, 1995.)、血管透過性促進活性 (D.R.Senger ら; Science, 219, 983, 1983.) が報告されている。VEGF は血管内皮細胞に極めて特異性の高い増殖因子であることが報告されている (N.Ferrara ら; Biochem. Biophys. Res. Comm., 161, 851, 1989.)。VEGF には Alternative splicing により 4 種類のタンパクが存在することが報告されている (K.A.Houck ら; J. Biol. Chem., 267, 26031, 1991.)。

血管新生を伴う疾患の中で、固形腫瘍の増殖、転移形成、糖尿病性網膜症、慢性関節リュウマチの病態形成に VEGF が深く関与していることが報告されている。固形腫瘍については、これまでに腎癌(A.Takahashi ら; Cancer Research, 54, 4233, 1994)、乳癌(L.F.Brown ら; Human Pathology, 26, 86, 1995)、脳腫瘍(R.A.Berkman ら; J. Clinical Investigation, 91, 153, 1993)、消化器癌(L.F.Brown ら; Cancer Research, 53, 4727, 1993)、卵巣癌(T.A.Olson ら; Cancer Research, 54, 276, 1994)などの多くのヒト腫瘍組織において VEGF が産生されていることが報告されている。乳癌については VEGF と患者の予後との関係が検討された結果、VEGF 高発現腫瘍は、低発現腫瘍に比べ、腫瘍血管新生が盛んであり生存率が低いことが明らかとなっている(M.Toi ら; Japanese J. Cancer Research, 85, 1045, 1994.)。

また、ヌードマウスにヒト腫瘍を皮下移植したゼノグラフトモデル実験系において、抗 VEGF モノクローナル抗体は腫瘍増殖抑制効果を示すことが報告されている(J.K.Kim ら ; Nature, 362, 841, 1993.)。さらに、ヌードマウスにおけるヒト腫瘍の転移癌モデルにおいて、抗 VEGF モノクローナル抗体は癌転移を抑制できることが報告されている(O.Melnyk ら ; Cancer Research, 56, 921, 1996)。従って、VEGF 活性を抑制することができれば癌患者における腫瘍の増殖、転移形成を抑制できるものと期待される。また、ヒトの癌性胸水、腹水中に高濃度の VEGF が検出されることから、胸水、腹水貯留の主要な因子である可能性も示され(S.Kondo ら ; Biochimica et Biophysica Acta, 1221, 211, 1994.)、VEGF をブロックすることで癌性胸水、腹水の貯留を防ぐことも期待される。

糖尿病網膜症においては、異常な血管新生により網膜剥離や硝子体出血をおこして失明にいたるが、糖尿病性網膜症における血管新生と患者眼球内の VEGF レベルが正相関することが報告されている(L.P.Aiello ら ; New England J. Medicine, 331, 1480, 1994)。また、サルの網膜症モデルにおいて抗 VEGF 中和モノクローナル抗体の眼内投与により VEGF 活性を抑制すると血管新生が抑制されることが報告されている (A.P.Adamis ら ; Arch Ophthalmol., 114, 66, 1996.)。従って、過剰に産生される VEGF 活性を抑制することで糖尿病性網膜症における血管新生を抑制できることが期待される。

慢性関節リュウマチの関節炎の病態の進展（骨、軟骨の破壊）には血管新生を伴うが、慢性関節リュウマチ患者の関節液中には VEGF が高濃度で含まれていること、関節中のマクロファージが VEGF を産生することが報告されている (A.E.Koch ら ; Journal of Immunology, 152, 4149, 1994; R.A.Fava ら ; J. Experimental Medicine, 180, 341, 1994.)。過剰に産生される VEGF 活性を抑制することで関節炎における血管新生を抑制できることが期待される。

ヒトの VEGF 受容体としては、これまでに受容体型チロシンキナーゼファミリーに属する受容体である Flt-1(fms-like tyrosine kinase)(M.Shibuya ら ; Oncogene,

5, 519, 1990; C.Vries ら ; Science, 255, 989, 1992.)および KDR(kinase insert domain-containing receptor) (B.I.Terman ら ; WO92/14748, Priority Feb.22, 1991; B.I.Terman ら ; Biochem. Biophys. Res. Comm., 187, 1579, 1992)が報告されている。ヒト型 VEGF 受容体 KDR のマウス型ホモログは Flk-1 (W.Matthews ら ; Proc. Natl. Acad. Science, USA, 88, 9026, 1991; A.Ullrich ら ; WO94/11499 Priority Nov. 13, 1992; B.Millauer ら ; Cell, 72, 835, 1993.)と命名されている。Flt-1 および KDR/Flk-1 の細胞外ドメインは 7 個のイムノグロブリン様ドメインよりなり、細胞内ドメインはチロシンキナーゼドメインを有する分子量 180~200 キロダルトンの膜タンパクよりなる。VEGF は、Flt-1 および KDR/Flk-1 に対して、それぞれ KD 値が 20 pM および 75 pM で特異的に結合する。Flt-1 および KDR/Flk-1 は血管内皮細胞に特異的に発現していると報告されている (T.P.Quinn ら ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 7533, 1993; R.L.Kendall ら ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 8915, 1993)。ヒト型受容体 KDR とマウス型受容体 Flk-1 のアミノ酸配列のホモロジーは、細胞内の N 末端側のチロシンキナーゼドメインおよび C 末端側のチロシンキナーゼドメインは、それぞれ 95% および 97% と非常に高いが、細胞外ドメイン間のホモロジーは 80% と少し低い (B. Barleon ら ; J. Cellular Biochemistry, 54, 56, 1994.)。

様々なヒトの疾患における KDR の発現については、ヒト脳腫瘍組織の腫瘍血管内皮細胞 (E. Hatva ら ; American J. Pathology, 146, 368, 1995.)、ヒト消化器癌組織の腫瘍血管内皮細胞 (L.F. Brown ら ; Cancer Research, 53, 4727, 1993.) においては正常組織の血管内皮細胞に比べ KDR の mRNA レベルの発現が上昇していることが報告されている。これらの結果は、腫瘍血管新生において VEGF-VEGF レセプター KDR 系が重要な役割を果たしていることを強く示唆するものである。さらに、慢性関節リュウマチ患者の関節の血管内皮細胞においても in situ hybridization により KDR mRNA の発現が認められることが報告されており (R.A. Fava ら ; J. Experimental Medicine, 180, 341, 1994.)、VEGF-VEGF レセプター

一KDR 系の重要性を示唆している。

VEGF レセプターKDR/Flk-1 の機能については、ブタ動脈の血管内皮細胞に KDR を発現させると VEGF に反応し増殖、遊走することから、VEGF の多様な活性の中で KDR は血管内皮細胞の増殖、遊走に関与すると報告されている (J. Waltenberger ら ; J. Biol. Chem., 269, 26988, 1994.)。また、マウス型 flk-1 遺伝子を破壊した flk-1 ノックアウトマウスは成熟した血管内皮細胞が全く認められず、卵黄嚢の血島も形成されず、子宮内で死亡したことから、動物個体においても KDR/flk-1 は血管内皮細胞の増殖、分化に関与することが報告されている (F. Shalaby ら ; Nature, 376, 62, 1995.)。

Flk-1 の細胞内チロシンキナーゼドメインを除去した不活性型の Flk-1 ミュータントを用い、ウイルスベクターにより内皮細胞に導入する方法を試みたところ、不活性型 Flk-1 ミュータントウイルスと腫瘍細胞を混合して動物細胞に移植すると腫瘍の増殖が抑制されることが報告されており (B. Millauer ら ; Nature, 367, 576, 1994.)、Flk-1 のシグナル伝達を阻害することで腫瘍増殖が抑制されることが示されている。

マウス型 Flk-1 細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体については、ラットモノクローナル抗体が報告されている。マウス型 Flk-1 の細胞外ドメインと FLAG<sup>TM</sup> 融合タンパクを免疫原に用いて、ラットよりハイブリドーマを作製し、取得した 3 種のラットモノクローナル抗体 4H3, 3B6, 3C8 は細胞上に発現したマウス Flk-1 を免疫沈降できると報告されているが、VEGF の機能阻害活性については解析されていない (A. Wilks ら ; WO 95/21865, Priority, 10 Feb. 1994.)。また、マウス型 Flk-1 の細胞外ドメインと SEAPs (Secretory alkaline phosphatase) 融合タンパクを免疫原に用いてラットにおいて作製したモノクローナル抗体 DC101 は、細胞表面のマウス Flk-1/fms キメラレセプター (細胞外ドメインが Flk-1 であり、細胞内ドメインが fms であるキメラ分子) に反応することが報告されている。DC101 は、VEGF 刺激によるマウス Flk-1/fms キメラレセプターの

fms チロシンキナーゼの自己リン酸化を阻害する活性を有する。しかしながら、Flk-1 チロシンキナーゼの自己リン酸化を阻害する活性については示されていない。ヌードマウスにヒト腫瘍を皮下移植したゼノグラフトモデル実験系において、DC101 は抗腫瘍効果を示すことが報告されている (P, Rockwell ら ; WO 95/21868, Priority, 10 Feb. 1994.)。DC101 はマウス型 Flk-1 に反応するが、ヒト型 KDR には反応しない。

ハイブリドーマ (Hybridoma, 16, 465-471, 1997.) には、ヒト KDR のイムノグロブリン様ドメインの 6、7 番目に特異的に反応する 2 種のマウスモノクローナル抗体 2-7-9 および 2-10-1 が報告されているが、ヒト型 VEGF 受容体 KDR のイムノグロブリン様ドメインの 1～5 番目に特異的に反応する抗体、あるいはヒト型 VEGF 受容体 KDR に結合し、かつ KDR の作用を中和する抗体は知られていない。

以上のことから、ヒト型 VEGF 受容体 KDR に結合し、かつ KDR の作用を中和する抗体はヒトにおける固形腫瘍の増殖、転移形成、慢性関節リュウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、乾癬など異常な血管新生により病態が進行する疾患の診断、治療に有用であることが期待される。しかしながら、ヒト VEGF 受容体 KDR を発現している細胞を検出でき、かつ、VEGF の作用を中和する抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体はこれまで確立されていない。先に述べたとおり、抗マウス型 Flk-1 に対するモノクローナル抗体を作製できることは報告されているが、ヒトの場合に有用である、リガンドである VEGF の結合を阻害する抗ヒト型 VEGF 受容体 KDR 抗体を作製することはこれまでに知られていない。

#### 発明の開示

本発明者らは、固形腫瘍の増殖、転移形成、慢性関節リュウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、乾癬など異常な血管新生により病態が進行する疾患を診断、治療するために有用なヒト型 VEGF 受容体 KDR に結合し、



かつ KDR の作用を中和するモノクローナル抗体の開発に関して鋭意検討し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、以下の (1) ~ (37) に関するものである。

(1) ヒト VEGF 受容体 KDR に反応するが、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 には反応しないモノクローナル抗体。

(2) モノクローナル抗体が、ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域に特異的に結合するモノクローナル抗体である、前記 (1) 記載のモノクローナル抗体。

(3) モノクローナル抗体が、ヒト VEGF のヒト VEGF 受容体 KDR への結合を阻害し、かつ KDR の作用を中和するモノクローナル抗体である、前記(1)記載のモノクローナル抗体。

(4) モノクローナル抗体が、ヒト VEGF 受容体 KDR の、配列番号 26 に記載されたアミノ酸配列 1 ~ 518 番目の領域にあるエピトープを認識するモノクローナル抗体である、前記 (1) ~ (3) のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体。

(5) モノクローナル抗体が、ヒト VEGF 受容体 KDR の、配列番号 26 に記載されたアミノ酸配列 1 ~ 104、1 ~ 194、105 ~ 393、295 ~ 393 および 394 ~ 518 番目から選ばれるアミノ酸配列の領域にあるエピトープを認識するモノクローナル抗体である、前記 (1) ~ (3) のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体。

(6) モノクローナル抗体が、マウス IgG1 サブクラスまたはマウス IgG2b サブクラスに属する、前記 (1) ~ (5) のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体。

(7) モノクローナル抗体が、モノクローナル抗体 KM1668、KM1992 および KM1995 から選ばれる、前記 (1) ~ (6) のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体。

(8) 前記 (1) ~ (7) のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を生産

するハイブリドーマ。

(9) ハイブリドーマが KM1668(FERM BP-6216)、KM1992(FERM BP-6217)または KM1995(FERM BP-6218)である、前記 (8) 記載のハイブリドーマ。

(10) モノクローナル抗体が、遺伝子組換え抗体である、前記 (1) ~ (7) のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体。

(11) 遺伝子組換え抗体が、ヒト化抗体、一本鎖抗体およびジスルフィド安定化抗体から選ばれるモノクローナル抗体である、前記 (10) 記載のモノクローナル抗体。

(12) ヒト化抗体がヒト型キメラ抗体である前記 (11) 記載の抗体。

(13) ヒト型キメラ抗体が、前記 (1) ~ (6) のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体の抗体重鎖 (H 鎖) 可変領域 (V 領域) および抗体軽鎖 (L 鎖) V 領域と、ヒト抗体の H 鎖定常領域 (C 領域) および L 鎖 C 領域とからなるキメラ抗体である前記 (12) 記載のヒト型キメラ抗体。

(14) H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のアミノ酸配列が、モノクローナル抗体 KM1668(FERM BP-6216)、モノクローナル抗体 KM1992(FERM BP-6217) またはモノクローナル抗体 KM1995(FERM BP-6218) から選ばれるモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、前記 (13) 記載のヒト型キメラ抗体。

(15) ヒト化抗体が CDR (相補性決定領域) 移植抗体である前記 (11) 記載の抗体。

(16) CDR 移植抗体が前記 (1) ~ (6) のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体の H 鎖および L 鎖の V 領域相補性決定領域と、ヒト抗体の H 鎖および L 鎖の C 領域および V 領域フレームワーク領域とからなる抗体である前記 (15) 記載の CDR 移植抗体。

(17) H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の相補性決定領域のアミノ酸配列が、モノクローナル抗体 KM1668(FERM BP-6216)、モノクローナル抗体 KM1992(FERM

BP-6217)またはモノクローナル抗体 KM1995(FERM BP-6218)から選ばれるモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域の相補性決定領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、前記(16)記載のCDR移植抗体。

(18) 一本鎖抗体が、抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域を含む、前記(11)記載の一本鎖抗体。

(19) 一本鎖抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列が、前記(1)～(6)から選ばれるモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、前記(18)記載の一本鎖抗体。

(20) 一本鎖抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域の相補性決定領域のアミノ酸配列が、(1)～(6)の1項から選ばれるモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域の相補性決定領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、前記(18)記載の一本鎖抗体。

(21) 一本鎖抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列が、モノクローナル抗体 KM1668(FERM BP-6216)、モノクローナル抗体 KM1992(FERM BP-6217)またはモノクローナル抗体 KM1995(FERM BP-6218)から選ばれるモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、前記(19)記載の一本鎖抗体。

(22) 一本鎖抗体のH鎖およびL鎖のV領域の相補性決定領域のアミノ酸配列が、モノクローナル抗体 KM1668(FERM BP-6216)、モノクローナル抗体 KM1992(FERM BP-6217)またはモノクローナル抗体 KM1995(FERM BP-6218)から選ばれるモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域の相補性決定領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、前記(20)記載の一本鎖抗体。

(23) ジスルフィド安定化抗体が、抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域を含む、前記(11)記載のジスルフィド安定化抗体。

(24) ジスルフィド安定化抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列が、前記(1)～(6)のいずれか1項から選ばれるモノクローナル抗体のH

鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、前記(23)記載のジスルフィド安定化抗体。

(25) ジスルフィド安定化抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の相補性決定領域のアミノ酸配列が、前記(1)～(6)のいずれか 1 項から選ばれるモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の相補性決定領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、前記(23)記載のジスルフィド安定化抗体。

(26) ジスルフィド安定化抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のアミノ酸配列が、モノクローナル抗体 KM1668(FERM BP-6216)、モノクローナル抗体 KM1992(FERM BP-6217)またはモノクローナル抗体 KM1995(FERM BP-6218)から選ばれるモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、前記(24)記載のジスルフィド安定化抗体。

(27) ジスルフィド安定化抗体の H 鎖および L 鎖の V 領域の相補性決定領域のアミノ酸配列が、モノクローナル抗体 KM1668(FERM BP-6216)、モノクローナル抗体 KM1992(FERM BP-6217)またはモノクローナル抗体 KM1995(FERM BP-6218)から選ばれるモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の相補性決定領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、前記(25)記載のジスルフィド安定化抗体。

(28) 前記(1)～(7)、(10)～(27)のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を用いてヒト VEGF 受容体 KDR を免疫学的に検出する方法。

(29) 前記(1)～(7)、(10)～(27)のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を用いてヒト VEGF 受容体 KDR を免疫学的に定量する方法。

(30) 前記(1)～(7)、(10)～(27)のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を用いてヒト VEGF 受容体 KDR を細胞表面に発現した細胞を免疫学的に検出する方法。

(31) 前記(1)～(7)、(10)～(27)のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を用いてヒト VEGF 受容体 KDR を細胞表面に発現した細胞を免疫学的に定量する

方法。

(32) 前記(1)～(7)、(10)～(27)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体を用いてヒト VEGF とヒト VEGF 受容体 KDR との結合を阻害する方法。

(33) 前記(1)～(7)、(10)～(27)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体を用いてヒト VEGF 受容体 KDR を中和する方法。

(34) 前記(1)～(7)、(10)～(27)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体を用いる、血管新生異常疾患の診断方法。

(35) 前記(1)～(7)、(10)～(27)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体を用いる、血管新生異常疾患の治療方法。

(36) 前記(1)～(7)、(10)～(27)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体を有効成分とする、血管新生異常疾患の診断薬。

(37) 前記(1)～(7)、(10)～(27)のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体を有効成分とする、血管新生異常疾患の治療薬。

前述したように、ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外ドメインは7個のイムノグロブリン様ドメインよりなる。ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外ドメインのN末端側から1番から7番までのイムノグロブリン様ドメインの模式図および該ドメインのアミノ酸配列におけるアミノ酸番号を第7図に示した。

本発明は、ヒト VEGF 受容体 KDR に反応するが、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 には反応しない抗体、ヒト VEGF 受容体 KDR の1～5番目のイムノグロブリン様ドメインに特異的に反応する抗体を提供する。本発明における抗体は、モノクローナル抗体、遺伝子組換え抗体などを包含する。

本発明におけるモノクローナル抗体は、ヒト VEGF 受容体 KDR に特異的に反応すればいかなるものでもよいが、以下に述べる製造法によって確立したものが好適なものとしてあげられる。すなわち、ヒト VEGF 受容体 KDR タンパクを抗原として調製し、抗原を免疫した動物より抗原特異性をもつ形質細胞を誘導し、さらに、それと骨髓腫細胞とを融合させてハイブリドーマを調製し、該ハ

イブリドーマを培養するか、あるいは該ハイブリドーマ細胞を動物に投与して該動物を腹水癌化させ、該培養液または腹水を分離、精製することにより取得された、抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体をあげることができる。

本発明の遺伝子組換え抗体は、上記本発明のモノクローナル抗体を遺伝子組換え技術を用いて改変したものである。遺伝子組換え抗体としては、ヒト化抗体、一本鎖抗体およびジスルフィド安定化抗体など、遺伝子組換えにより製造される抗体をあげることができる。遺伝子組換え抗体において、モノクローナル抗体の特徴を有し、抗原性が低く、血中半減期が延長されたものは、治療薬として好ましい。

本発明におけるヒト化抗体とは、ヒト型キメラ抗体およびヒト型 CDR (Complementary Determining Region; 相補性決定領域 以下、CDR と記す) 移植抗体を包含する。

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体可変領域重鎖 (以下、VH と称す) および可変領域軽鎖 (以下、VL と称す) とヒト抗体の定常領域重鎖 (以下、CH と称す) およびヒト抗体の定常領域軽鎖 (以下、CL と称す) とからなる抗体を意味する。ヒト型 CDR 移植抗体は、ヒト抗体に、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR をヒト以外の動物の抗体の CDR 配列でそれぞれ置換した抗体を意味する。

本発明のヒト型キメラ抗体は、ヒト VEGF 受容体 KDR に結合し、KDR の作用を中和するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより、VH および VL をコードする cDNA を取得し、ヒト抗体 CH およびヒト抗体 CL をコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ製造することができる。

本発明の ヒト型 CDR 移植抗体は、ヒト VEGF 受容体 KDR に反応し、ヒト VEGF 受容体 KDR に結合し、KDR の作用を中和する、ヒト以外の動物の抗体の

VH および VL の CDR 配列で任意のヒト抗体の VH および VL の CDR 配列をそれぞれ置換した V 領域をコードする cDNA を構築し、ヒト抗体の CH およびヒト抗体の CL をコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入し、発現させることにより製造することができる。

本発明のヒト型キメラ抗体およびヒト型 CDR 移植抗体はいずれのイムノグロブリン(Ig)クラスに属するものでもよいが IgG 型のものが好適であり、さらに IgG 型に属する IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 等のイムノグロブリンの C 領域のいずれも用いることができる。

さらに、本発明はヒト VEGF 受容体 KDR に対して結合性を示す一本鎖抗体 (single chain Fv; 以下、scFv と称す) あるいはジスルフィド安定化抗体(disulfide stabilized Fv; 以下、dsFv と称す) を提供する。

一本鎖抗体 (scFv) とは、一本の VH と一本の VL とを適当なペプチドリンカー (以下、L と称す) を用いて連結した、VH-L-VL ないしは VL-L-VH ポリペプチドを示す。本発明の scFv に含まれる VH および VL は、抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体あるいはヒト型 CDR 移植抗体のいずれをも用いることができる。

ジスルフィド安定化抗体 (dsFv) とは VH および VL 中のそれぞれ 1 アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドをジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基は Reiter らにより示された方法 [プロテイン・エンジニアリング (Protein Engineering), 7, 697 (1994)] に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。本発明のジスルフィド安定化抗体に含まれる VH あるいは VL はマウス型抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体あるいはヒト型 CDR 移植抗体のいずれをも用いることができる。

ヒト VEGF 受容体 KDR に対して結合性を示す一本鎖抗体は、ヒト VEGF 受容

体 KDR に結合し、KDR の作用を中和する抗体を生産するハイブリドーマより VH および VL をコードする cDNA を取得し、一本鎖抗体発現ベクターを構築し、大腸菌、酵母、あるいは動物細胞へ導入することにより発現させ製造することができる。

ヒト VEGF 受容体 KDR に対して結合性を示すジスルフィド安定化抗体は、ヒト VEGF 受容体 KDR に反応する抗体を生産するハイブリドーマより VH および VL をコードする cDNA を取得し、適当な発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを大腸菌、酵母、あるいは動物細胞へ導入し発現させることにより製造することができる。

本発明の抗体は、ヒト VEGF 受容体 KDR に結合し、ヒト VEGF のヒト VEGF 受容体 KDR への結合を阻害し、KDR の作用を中和するため、ヒト VEGF が有する血管内皮細胞に対する増殖促進活性、遊走促進活性、マトロプロテアーゼ分泌促進活性、ウロキナーゼ、tPA 分泌促進活性、in vivo 血管新生促進活性、血管透過性亢進活性等を阻害することができる。したがって、本発明は、固形腫瘍の増殖もしくは転移形成、慢性関節リウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、乾癬など血管新生の異常により病態が進行する疾患の診断および治療に利用することができる。

以下に、本発明の抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体、抗ヒト VEGF 受容体 KDR ヒト化抗体、抗ヒト VEGF 受容体 KDR 一本鎖抗体および抗ヒト VEGF 受容体 KDR ジスルフィド安定化抗体の製造法、ならびに該抗体によるヒト VEGF 受容体 KDR の検出および定量法について説明する。

## 1. 抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体の作製方法

### (1) 抗原の調製

抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体を作製するために必要な抗原としては、ヒト VEGF 受容体 KDR を細胞表面に発現した細胞あるいはその細胞膜画分、または、アミノ酸の長さの異なる細胞外領域を有する可溶性ヒト VEGF



受容体 KDR 蛋白質あるいは該蛋白質と抗体の Fc 部分との融合蛋白質などがあげられる。

ヒト VEGF 受容体 KDR を細胞表面に発現する細胞としては、NIH3T3-KDR 細胞 [セルグロース アンド ディファレンシエーション (Cell Growth & Differentiation) 7, 213, 1996.] があげられる。長さの異なる細胞外領域を有する可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 蛋白質あるいは該蛋白質と抗体の Fc 部分との融合蛋白質として発現させる方法としては、ヒト VEGF 受容体 KDR をコードする全長あるいはその部分断片 cDNA [セルグロース アンド ディファレンシエーション (Cell Growth & Differentiation) 7, 213, 1996.] を適当なベクターのプロモーター下流に挿入した組み換え体ベクターを造成し、それを宿主細胞に導入することにより得られたヒト VEGF 受容体 KDR 発現細胞を、適当な培地中で培養することにより細胞内あるいは培養上清中にヒト VEGF 受容体 KDR の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として生産することができる。また、上述の蛋白質の部分配列を有するポリペプチドをアミノ酸合成機を用いて合成することによっても調製することができる。

宿主としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞など、目的とする遺伝子を発現できるものであれば、いずれでもよい。細菌としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*)、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) 等のエシェリヒア属、バチルス属等の細菌が例示される。酵母としては、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) 等が例示される。動物細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ細胞、サルの細胞である COS 細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞である CHO 細胞等が例示される。昆虫細胞としては、Sf9、Sf21 (ファーマインジェン社製)、High Five (インビトロジェン社製) 等が例示される。

本発明の DNA を導入するベクターとしては、該 DNA を組み込むことができ、宿主細胞で発現できるものであればいかなるベクターでも用いることができる。

細菌、例えばエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) を宿主として用いる場合の発現ベクターとしては、プロモーター、リボゾーム結合配列、本発明の DNA、転写終結配列、場合によってはプロモーターの制御配列より構成されているのが好ましいが、例えば、市販の pGEX (ファルマシア社製)、pET システム (ノバジェン社製) などが例示される。

細菌への組換えベクターの導入方法としては、細菌に DNA を導入する方法であれば、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・U. S. A. (Proc. Natl. Acad. Sci., USA), 69, 2110-2114 (1972) ]、プロトプラスト法 (特開昭 63-248394) 等、いずれの方法も用いられる。

酵母を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YE p 1 3 (ATCC37115)、YE p 2 4 (ATCC37051)、YC p 5 0 (ATCC37419) 等が用いられる。

酵母への組換えベクターの導入方法としては、酵母に DNA を導入する方法であれば、例えば、エレクトロポレーション法 [メソッズ・オブ・エンザイモロジー (Methods. Enzymol.), 194, 182-187 (1990)]、スフェロプラスト法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・U. S. A. (Proc. Natl. Acad. Sci., USA), 84, 1929-1933 (1978) ]、酢酸リチウム法 [ジャーナル・オブ・バクテリオロジー (J. Bacteriol.), 153, 163-168 (1983) ] 等、いずれの方法も用いられる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、p A G E 1 0 7 [特開平 3-22979 ; サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990) ]、p A G E 1 0 3 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.) 101, 1307 (1987) ] 等が用いられる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいかなるものを用いてもよいが、例えば、サイトメガロウィルス (CMV) の IE (immediate early)

遺伝子のプロモーター、SV40 あるいはメタロチオネインのプロモーター等があげられる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターとともに用いてもよい。

動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であれば、例えば、エレクトロポレーション法〔サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133(1990)〕、リン酸カルシウム法 (特開平 2-227075)、リポフェクション法〔プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・U. S. A. (Proc. Natl. Acad. Sci., USA), 84, 7413 (1987)〕等、いずれの方法も用いられる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、サプPLEMENT 1～34 (Current Protocols in Molecular Biology Supplement 1-34)、バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル (Baculovirus expression vectors A laboratory manual) 等に記載された方法によって、タンパク質を発現することができる。すなわち、以下に述べる組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得たのち、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、タンパク質発現昆虫細胞を取得する。

遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにインビトロジェン社製) 等が用いられる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) などが用いられる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平 2-227075)、リポフェクション法〔プロシーディングス・オブ・

ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・U. S. A. (Proc. Natl. Acad. Sci., USA), 84, 7413 (1987)] 等が用いられる。

また、ファーマンジェン社製バキュロゴールドスターターキットなどを用いて組み換えバキュロウィルスを作製したのち、前述した Sf9、Sf21 あるいは High Five 等の昆虫細胞に該組み換えウィルスを感染させることにより蛋白質を生産させることもできる [バイオテクノロジー (Bio/Technology), 6, 47(1988)]。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、分泌生産、融合蛋白質発現等が開発されており、いずれの方法も用いることができる。例えば、モレキュラー・クローニング 第2版、コールドスプリングハーバーラボ・プレス [Molecular Cloning 2nd edition, Cold Spring Harbor Lab. Press New York (1989); 以下、「モレキュラー・クローニング 第2版」と記す] に記載されている方法に準じて行うことができる。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明の蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、ヒト VEGF 受容体 KDR の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として製造することができる。

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

大腸菌あるいは酵母等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい (モレキュラー・クローニング 第2版)。培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下、15～40℃で 16～96 時間行う。培養期間中、pH は 3.0～9.0 に保持する。pH の調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。培養中は必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加

してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI 1640培地、EagleのMEM培地またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。培養は、通常5%CO<sub>2</sub>存在下、35～37℃で3～7日間行い、培養中は必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地[ファーミンゲン(Pharmingen)社製]、Sf900IIISFM[ライフテクノロジーズ(Life Technologies)社製]、ExCell400、ExCell405[いずれもJRHBaiobiosciences(JRH Biosciences)社製]等が用いられる。培養は、25～30℃で1～4日間行い、培養中は必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上記において、動物細胞および昆虫細胞の培養において可能であれば、ヒトVEGF受容体KDRの全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質の精製を容易にするため、血清無添加の培地を用いることが好ましい。

ヒトVEGF受容体KDRの全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として宿主細胞内に蓄積された場合には、培養終了後、細胞を遠心分離し、水系緩衝液にけん濁後、超音波法、フレンチプレス法などにより細胞を破碎し、その遠心分離上清に該蛋白質を回収する。

さらに、細胞内に不溶体を形成した場合には、不溶体をタンパク質変性剤で可溶化後、タンパク質変性剤を含まないあるいはタンパク質変性剤の濃度がタンパク質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、或いは透析し、タンパク質の立体構造を形成させることができる。

ヒトVEGF受容体KDRの全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として細胞外に分泌された場合には、培養上清中に発現蛋白質を回収することができる。

単離精製については、溶媒抽出、有機溶媒による分別沈殿、塩析、透析、遠心分離、限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、結晶化、電気泳動などの分離操作を単独あるいは組み合わせて行うことができる。

## (2) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

上記で得られた該蛋白質を抗原として免疫する。免疫する方法としては、動物の皮下、静脈内または腹腔内に抗原をそのまま投与してもよいが、抗原性の高いキャリアタンパク質を結合させて投与したり、あるいは適当なアジュバントとともに抗原を投与することが好ましい。

キャリアタンパク質としては、スカシガイヘモシアニン、キーホールリンペットヘモシアニン、牛血清アルブミン、牛チログロブリン等があげられ、アジュバントとしては、フロインドの完全アジュバント(Complete Freund's Adjuvant)、水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチン等があげられる。

免疫動物としては、ウサギ、ヤギ、マウス、ラット、ハムスターなどの非ヒト哺乳動物があげられる。

抗原の投与は、1回目の投与の後、1～2週間毎に3～10回行う。抗原の投与量は動物1匹当たり50～100  $\mu$ gが好ましい。各投与後、3～7日目に免疫動物の眼底静脈叢あるいは尾静脈より採血し、該血清の抗原との反応性について、酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法(ELISA法)：医学書院刊(1976年)〕などで確認する。

そして、該血清が十分な抗体価を示した非ヒト哺乳動物を、抗体産生細胞の供給源とする。

抗原の最終投与後3～7日目に、免疫動物より公知の方法〔アンティボディー・ア・ラボラトリー・マニュアル、コールド・スプリングハーバー・ラボラトリー (Antibodies-A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)、

以下、アンチボディース・ア・ラボラトリー・マニュアルと記す] に準じてリンパ球を摘出し、リンパ球と骨髓腫細胞とを融合させる。

### (3) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞である、8-アザグアニン耐性マウス (BALB/c 由来) 骨髓腫細胞株 P3-X63Ag8-U1(P3-U1) [G.Kohler ら; ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー (Europ. J. Immunol.), 6, 511(1976) ]、SP2/0-Ag14(SP-2) [M.Shulman ら; ネイチャー (Nature), 276, 269(1978)]、P3-X63-Ag8653(653) [J.F.Kearney ら; ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunol.), 123, 1548(1979)]、P3-X63-Ag8(X63) [G.Kohler ら; ネイチャー (Nature), 256, 495(1975)] など、イン・ビトロ (in vitro) で増殖可能な骨髓腫細胞であればいかなるものでもよい。これらの細胞株の培養および継代については公知の方法 (アンチボディース・ア・ラボラトリー・マニュアル) に従い、細胞融合時までに  $2 \times 10^7$  個以上の細胞数を確保する。

### (4) 細胞融合とモノクローナル抗体の選択

上記で得られた抗体産生細胞と骨髓腫細胞とを洗浄したのち、ポリエチレングライコール-1000(PEG-1000)などの細胞凝集性媒体を加え、細胞を融合させ、培地中に懸濁させる。細胞の洗浄にはMEM培地またはPBS (リン酸二ナトリウム1.83g、リン酸一カリウム0.21g、食塩7.65g、蒸留水1 リットル、pH7.2) などを用いる。また、融合細胞を懸濁させる培地としては、目的の融合細胞のみを選択的に得られるように、HAT 培地 {正常培地 [RPMI-1640 培地にグルタミン(1.5mM)、2-メルカプトエタノール ( $5 \times 10^{-5}$ M)、ジェンタマイシン(10  $\mu$ g/ml) および牛胎児血清(FCS) (CSL 社製、10%) を加えた培地] にヒポキサンチン ( $10^{-4}$ M)、チミジン ( $1.5 \times 10^{-5}$ M) およびアミノプテリン ( $4 \times 10^{-7}$ M) を加えた培地} を用いる。

培養後、培養上清の一部をとり、酵素免疫測定法により、抗原蛋白質に反応し、非抗原蛋白質に反応しないサンプルを選択する。ついで、限界希釈法によ

りクローニングを行い、酵素免疫測定法により安定して高い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

#### 酵素免疫測定法

抗原蛋白質あるいは抗原蛋白質を発現した細胞などをプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは上述の方法で得られる精製抗体を第一抗体として反応させる。

第一抗体反応後、プレートを洗浄して第二抗体を添加する。

第二抗体とは、第一抗体を認識できる抗体に、ビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識したものである。具体的には、ハイブリドーマ作製の際にマウスを用いたのであれば、第二抗体としては、マウスイムノグロブリンを認識できる抗体を用いる。

反応後、第二抗体を標識した物質に応じた反応を行い、抗原に特異的に反応するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

本発明ハイブリドーマ株の具体例としては、ハイブリドーマ株 KM1668、KM1992 および KM1995 が挙げられる。ハイブリドーマ株 KM1668、KM1992 および KM1995 は、平成 10 年 1 月 21 日付で、それぞれ工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号）に、FERM BP-6216、FERM BP-6217、FERM BP-6218 として寄託されている。

#### (5) モノクローナル抗体の調製

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞を培養して得られる培養液、またはプリスタン処理〔2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン(Pristane)0.5ml を腹腔内投与し、2 週間飼育する〕した 8 ～10 週令のマウスまたはヌードマウスに、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞を腹腔内投与して腹水癌化させた腹水から、分離、精製することにより調製できる。

モノクローナル抗体を分離、精製する方法としては、遠心分離、40～50% 飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿法、DEAE-セファロースカラ



ム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG- カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて行う方法があげられる。この方法により、IgG あるいは IgM 画分を回収し、精製モノクローナル抗体を取得することができる。

精製モノクローナル抗体のサブクラスの設定は、モノクローナル抗体タイピングキットなどを用いて行うことができる。蛋白質量は、ローリー法あるいは280nm での吸光度より算出することができる。

抗体のサブクラスとは、クラス内のアイソタイプのことで、マウスでは、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、ヒトでは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 があげられるが、特にマウス IgG1、IgG2a、ヒト IgG1 タイプは、補体依存性細胞傷害活性（以下、CDC 活性）および抗体依存性細胞傷害活性（以下、ADCC 活性）を有し、治療への応用上、有用である。

## 2. 抗ヒト VEGF 受容体 KDR ヒト化抗体の作製

### (1) ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト以外の動物の抗体からヒト化抗体を作製するために必要なヒト化抗体発現用ベクターを構築する。ヒト化抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体の C 領域である CH および CL をコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子をそれぞれ挿入することにより構築されたものである。ヒト抗体の C 領域としては、例えば、ヒト抗体 H 鎖では C $\gamma$ 1 や C $\gamma$ 4、ヒト抗体 L 鎖では C $\kappa$ 等の任意のヒト抗体の C 領域を用いることができる。ヒト抗体の C 領域をコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンより成る染色体 DNA を用いることができ、また、cDNA を用いることもできる。動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体 C 領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオ

ケミストリー(J.Biochem.), 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [ジーン(Gene), 27, 223 (1984)]、pKCR [プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc.Natl.Acad.Sci.), 78, 1527 (1981)]、pSG1  $\beta$  d2-4 [サイトテクノロジー(Cytotechnology), 4, 173 (1990)] 等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40 の初期プロモーターとエンハンサー [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J.Biochem.), 101, 1307(1987)]、モロニーマウス白血病ウイルスの LTR プロモーターとエンハンサー [バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochem.Biophys.Res.Comun.), 149, 960(1987)]、および免疫グロブリン H 鎖のプロモーター[セル(Cell), 41, 479 (1985)]とエンハンサー[セル(Cell), 33, 717 (1983)] 等があげられる。

ヒト化抗体発現用ベクターは、抗体 H 鎖、L 鎖が別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一のベクター上に存在するタイプ (タンデム型) のどちらでも用いることができるが、ヒト化抗体発現ベクターの構築のしやすさ、動物細胞への導入のし易さ、動物細胞内での抗体 H 鎖および L 鎖の発現量のバランスがとれる等の点でタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ (J.Immunol.Methods), 167, 271(1994)]。

## (2) ヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA の取得

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体の VH および VL をコードする cDNA は以下のようにして取得する。

抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体を産生する細胞、例えば、マウスヒト VEGF 受容体 KDR 抗体産生ハイブリドーマ等より mRNA を抽出し、cDNA を合成する。合成した cDNA を、ファージあるいはプラスミドなどのベクターに挿入し、cDNA ライブラリーを作製する。該ライブラリーより、ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体の C 領域部分あるいは V 領域部分をプローブと

して用い、VH をコードする cDNA を有する組換えファージあるいは組換えプラスミド、および VL をコードする cDNA を有する組換えファージあるいは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージあるいは組換えプラスミド上の目的とする抗体の VH および VL の全塩基配列を決定し、塩基配列より VH および VL の全アミノ酸配列を推定する。

### (3) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

前記 2 (1) で構築したヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子上流に、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA を挿入し、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、キメラ抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子上流に、あらかじめヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA をクローニングするための制限酵素の認識配列を設けておき、このクローニングサイトにヒト以外の動物の抗体の V 領域をコードする cDNA を下記に述べる合成 DNA を介して挿入することにより、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを製造することができる。合成 DNA は、ヒト以外の動物の抗体の V 領域の 3'末端側の塩基配列とヒト抗体の C 領域の 5'末端側の塩基配列とからなるものであり、両端に適当な制限酵素部位を有するように DNA 合成機を用いて製造する。

### (4) ヒト以外の動物の抗体の CDR 配列の同定

抗体の抗原結合部位を形成する VH 及び VL は、配列の比較的保存された 4 個のフレームワーク領域（以下、FR 領域と称す）とそれらを連結する配列の変化に富んだ 3 個の相補性決定領域（CDR）から成っている [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services, 1991]。そして各 CDR アミノ酸配列（CDR 配列）は、既知の抗体の V 領域のアミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト

(Sequences of Proteins of Immunological Interest) , US Dept. Health and Human Services, 1991] と比較することにより同定することができる。

(5) ヒト型 CDR 移植抗体の V 領域をコードする cDNA の構築

ヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA は以下のようにして取得することができる。

まず、目的のヒト以外の動物の抗体の V 領域の CDR を移植するためのヒト抗体の V 領域の FR のアミノ酸配列を VH、VL それぞれについて選択する。ヒト抗体の V 領域の FR のアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来の V 領域の FR のアミノ酸配列であればいかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bank に登録されているヒト抗体の V 領域の FR のアミノ酸配列、ヒト抗体の V 領域の FR の各サブグループの共通アミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest) , US Dept. Health and Human Services, 1991] があげられるが、十分な活性を有するヒト型 CDR 移植抗体を創製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体の V 領域のアミノ酸配列と高い相同性、好ましくは 65% 以上の相同性を有することが望ましい。次に、選択したヒト抗体の V 領域の FR のアミノ酸配列をコードする DNA 配列と目的のヒト以外の動物の抗体の V 領域の CDR のアミノ酸配列をコードする DNA 配列を連結させて、VH、VL それぞれのアミノ酸配列をコードする DNA 配列を設計する。CDR 移植抗体可変領域遺伝子を構築するために設計した DNA 配列を得るためには、全 DNA 配列をカバーするように各鎖について数本の合成 DNA を設計し、それらを用いてポリメラーゼ・チェイン・リアクション (Polymerase Chain Reaction ; 以下、PCR と記す) を行う。PCR での反応効率および合成可能な DNA の長さから各鎖について、好ましくは、6 本の合成 DNA を設計する。反応後、増幅断片を適当なベクターにサブクローニングし、その塩基配列を決定し、目的のヒト型 CDR 移植抗体の各鎖の V 領域のアミノ酸配列をコードする cDNA を含むプラスミドを取得

する。また、約 100 塩基よりなる合成 DNA を用いてセンス、アンチセンスともに全配列を合成し、それらをアニーリング、連結することで、目的のヒト型 CDR 移植抗体の各鎖の V 領域のアミノ酸配列をコードする cDNA を構築することもできる。

#### (6) ヒト型 CDR 移植抗体の V 領域のアミノ酸配列の改変

ヒト型 CDR 移植抗体は目的のヒト以外の動物の抗体の V 領域の CDR のみをヒト抗体の V 領域の FR 間に、単純に移植しただけでは、その活性はもとのヒト以外の動物の抗体の活性に比べて低下してしまうことが知られている [バイオテクノロジー (BIO/TECHNOLOGY), 9, 266 (1991)]。そこでヒト抗体の V 領域の FR のアミノ酸配列のうち、直接抗原との結合に参与しているアミノ酸残基、CDR のアミノ酸残基と相互作用をしているアミノ酸残基、あるいは抗体の立体構造の維持に参与している等の可能性を有するアミノ酸残基をもとのヒト以外の動物の抗体に見出されるアミノ酸残基に改変し、活性を上昇させることが行われている。そして、それらのアミノ酸残基を効率よく同定するため、X 線結晶解析あるいはコンピューターモデリング等を用いた抗体の立体構造の構築および解析を行っている。しかし、いかなる抗体にも適応可能なヒト型 CDR 移植抗体の製造法は未だ確立されておらず、現状では個々の抗体によって種々の試行錯誤が必要である。

選択したヒト抗体の V 領域の FR のアミノ酸配列の改変は各種の変異導入プライマーを用いて前記 2 (5) に記載の PCR を行うことにより達成できる。PCR 後の増幅断片を適当なベクターにサブクローニング後、その塩基配列を決定し、目的の変異が導入された cDNA を含むベクター (以下、アミノ酸配列改変ベクターと称す) を取得する。

また、狭い領域のアミノ酸配列の改変であれば、20~35 塩基からなる変異導入プライマーを用いた PCR 変異導入法により行うことができる。具体的には、改変後のアミノ酸残基をコードする DNA 配列を含む 20~35 塩基からなるセン

ス変異プライマー及びアンチセンス変異プライマーを合成し、改変すべき V 領域のアミノ酸配列をコードする cDNA を含むプラスミドを鋳型として 2 段階の PCR を行う。最終増幅断片を適当なベクターにサブクローニング後、その塩基配列を決定し、目的の変異が導入された cDNA を含むアミノ酸配列改変ベクターを取得する。

#### (7) ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターの構築

前記 2 (1) のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH 及び CL をコードする遺伝子上流に、前記 2 (5) および 2 (6) で取得したヒト型 CDR 移植抗体の VH 及び VL をコードする cDNA を挿入し、ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、ヒト型 CDR 移植抗体の VH 及び VL のアミノ酸配列をコードする cDNA を構築するための PCR の際に 5' 末端および 3' 末端の合成 DNA の末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、所望のヒト抗体の C 領域をコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するように挿入することができる。

#### (8) ヒト化抗体の一過性 (トランジェント) 発現および活性評価

多種類のヒト化抗体の活性を効率的に評価するために、前記 2 (3) のヒト型キメラ抗体発現ベクター、および前記 2 (7) のヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターあるいはそれらの改変ベクターを COS-7 細胞 (ATCC CRL1651) に導入してヒト化抗体の一過性発現 [メソッズ・イン・ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Methods in Nucleic Acids Res. ), CRC Press, p.283, 1991] を行い、その活性を測定することができる。

COS-7 細胞への発現ベクターの導入法としては、DEAE- デキストラン法 [メソッズ・イン・ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Methods in Nucleic Acids Res. ), CRC Press, p.283, 1991]、リポフェクション法 [プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス [Proc. Natl. Acad. Sci., 84, 7413 (1987)] 等があげられる。

ベクターの導入後、培養上清中のヒト化抗体の活性は前記 1 (5) に記載の酵素免疫測定法 (ELISA 法) 等により測定することができる。

(9) ヒト化抗体の安定 (ステーブル) 発現および活性評価

前記 2 (3) のヒト型キメラ抗体発現ベクターおよび前記 2 (7) のヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することによりヒト化抗体を安定に生産する形質転換株を得ることができる。

宿主細胞への発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法 [特開平 2-257891、サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] 等があげられる。

ヒト化抗体発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト化抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、マウス SP2/0-Ag14 細胞 (ATCC CRL1581)、マウス P3X63-Ag8.653 細胞 (ATCC CRL1580)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (以下、DHFR 遺伝子と称す) が欠損した CHO 細胞 [プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.), 77, 4216 (1980)]、ラット YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞 (ATCC CRL1662、以下、YB2/0 細胞と称す) 等があげられる。

ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に生産する形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、G418 および FCS を含む RPMI1640 培地により選択する。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養液中にヒト化抗体を生産蓄積させることができる。培養液中のヒト化抗体の活性は前記 1 (5) に記載の方法などにより測定する。また、形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、DHFR 遺伝子増幅系等を利用してヒト化抗体の生産量を上昇させることができる。

ヒト化抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテイン A カラムを用いて精製することができる [アンチボディズ (Antibodies), A Laboratory Manual, Cold Spring

Harbor Laboratory, Chapter 8, 1988 ; 以下、「アンチボデイズ」と記す]。また、その他に、通常の蛋白質で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーおよび限外濾過等を組合せて行い、精製することができる。精製したヒト化抗体の H 鎖、L 鎖あるいは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) [ネイチャー (Nature), 227, 680 (1970)] やウエスタンブロッティング法 (アンチボデイズ, Chapter 12, 1988) 等で測定する。

精製したヒト化抗体の反応性、また、ヒト化抗体の VEGF に対する阻害活性の測定は前記 1 (4) に記載の方法などにより測定することができる。

#### (10) ヒト化抗体の使用法

本発明のヒト化抗体はヒト VEGF 受容体 KDR と特異的に結合し、KDR の作用を中和する。このため、本発明により提供されるヒト化抗体は固形腫瘍の増殖もしくは転移形成、慢性関節リウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、乾癬など過剰な VEGF 産生による血管新生の異常により病態が進行する疾患においてその治療等に有用であると考えられる。また、ヒト以外の動物の抗体に比べ、ヒト抗体のアミノ酸配列に由来する部分がほとんどであるため、ヒト体内で免疫原性を示さず、その効果が長期間にわたり持続することが期待される。本発明のヒト化抗体は単独でまたは少なくとも 1 種以上の製剤上許容される補助剤と共に用いることができる。例えば、ヒト化抗体を、生理食塩水やグルコース、ラクトース、マンニトール等の水溶液に溶解して適当な医薬組成物とする。または、ヒト化抗体を常法に従って凍結乾燥し、これに塩化ナトリウムを加えることによって粉末注射剤を作製する。本医薬組成物は必要に応じ、製剤分野で周知の添加剤、例えば、製剤上許容される塩等を含有することができる。

本医薬組成物の投与量は、患者の年齢、症状等によって異なるが、ヒトを含む哺乳動物に対し、ヒト化抗体を 0.1 ~20mg/kg/日投与する。投与は、1 日 1 回



(単回投与または連日投与) または間歇的に 1 週間に 1 ～3 回、2 、3 週間に 1 回静脈注射により行う。

### 3. 抗ヒト VEGF 受容体 KDR 一本鎖抗体の作製

#### (1) 一本鎖抗体発現ベクターの構築

前記 2 (2)、2 (5) および 2 (6) に記載のヒト以外の動物の抗体あるいはヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA を一本鎖抗体発現ベクターに挿入することによりヒト以外の動物の抗体の一本鎖抗体あるいはヒト型 CDR 移植抗体の一本鎖抗体の発現ベクターを構築することができる。ここで用いる一本鎖抗体発現ベクターとしてはヒト以外の動物の抗体あるいはヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA を組み込み発現できるものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J.Biochem.), 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [ジーン(Gene), 27, 223(1984)]、pKCR [プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.), 78, 1527 (1981)]、pSG1  $\beta$  d2-4 [サイトテクノロジー(Cytotechnology), 4, 173 (1990)] 等があげられる。一本鎖抗体を発現させるための宿主としては、大腸菌、酵母、動物細胞等の中から適切なものを選択することができるが、その場合の発現用ベクターとしては、それぞれの宿主に適切なものを選択する必要がある。また、適切なシグナルペプチドをコードする cDNA を発現用ベクターに挿入することで一本鎖抗体を細胞外に分泌させ、ペリプラズマ領域に輸送させ、あるいは細胞内に留まらせることができる。

選択された発現用ベクターに、VH-L -VL あるいは VL-L -VH (Lはペプチドリンカー) からなる一本鎖抗体をコードする cDNA を適切なプロモーター、シグナルペプチドの下流に挿入することにより、目的の一本鎖抗体をコードする cDNA が挿入された一本鎖抗体発現ベクターを構築することができる。

一本鎖抗体をコードする cDNA は、VH をコードする cDNA と VL をコードする cDNA とを、両端に適当な制限酵素の認識配列を有するペプチドリンカーをコードする合成 DNA を用いて連結することにより得ることができる。リンカーペプチドは、その付加が VH、VL の抗原への結合に対して妨害しないように最適化することが重要で、例えば Pantoliano らにより示されたもの [バイオケミストリー (Biochemistry), 30, 10117(1991)] あるいはそれを改変したものを用いることができる。

## (2) 一本鎖抗体の発現および活性評価

前記 3 (1) で構築した一本鎖抗体発現ベクターをエレクトロポレーション法 [特開平 2-257891、サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990)] 等の方法により適切な宿主細胞へ導入することにより、目的の一本鎖抗体を生産する形質転換株を取得することができる。発現ベクターの導入後、培養上清等に含まれる一本鎖抗体の活性は前記 1 (4) に記載の方法等により測定することができる。

本発明の一本鎖抗体の回収および精製は公知の技術を組み合わせることにより達成することができる。例えば、一本鎖抗体が培地中に分泌されるならば、限外濾過により濃縮することができ、次いで抗原アフィニティークロマトグラフィーもしくはイオン交換クロマトグラフィーまたはゲル濾過を実行することにより達成することができる。また、宿主細胞のペリプラズマ領域へと輸送されるならば、その細胞に浸透圧ショックを与え、限外濾過により濃縮することができ、次いで抗原アフィニティークロマトグラフィーもしくはイオン交換クロマトグラフィーまたはゲル濾過を実行することにより達成することができる。不溶性であり、かつ顆粒 (インクルージョン・ボディー) として存在している一本鎖抗体は、細胞の溶解、顆粒を単離するための遠心分離と洗浄を繰り返し、例えばグアニジナー塩酸による可溶化、および再度一本鎖抗体の活性を有する構造へと導く操作、それに続く活性分子の精製によって達成することができる。

そして、精製された一本鎖抗体の活性は前記 1 (4) に記載の方法等により測定することができる。

### (3) 一本鎖抗体の使用法

本発明の一本鎖抗体はヒト VEGF 受容体 KDR と特異的に結合し、KDR の作用を中和する。このため、本発明により提供される一本鎖抗体は、固形腫瘍の増殖もしくは転移形成、慢性関節リウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、乾癬など過剰な VEGF 産生による血管新生の異常により病態が進行する疾患においてその治療等に有用であると考えられる。本発明の一本鎖抗体は単独でまたは少なくとも 1 種以上の製剤上許容される補助剤と共に用いることができる。例えば、一本鎖抗体を、生理食塩水やグルコース、ラクトース、マンニトール等の水溶液に溶解して適当な医薬組成物とする。または、一本鎖抗体を常法に従って凍結乾燥し、これに塩化ナトリウムを加えることによって粉末注射剤を作製する。本医薬組成物は必要に応じ、製剤分野で周知の添加剤、例えば、製剤上許容される塩等を含有することができる。

本医薬組成物の投与量は、患者の年齢、症状等によって異なるが、ヒトを含む哺乳動物に対し、一本鎖抗体を 0.1~20mg/kg/日投与する。投与は、1 日 1 回 (単回投与または連日投与) または間歇的に 1 週間に 1~3 回、2、3 週間に 1 回静脈注射により行う。

## 4. 抗ヒト VEGF 受容体 KDR ジスルフィド安定化抗体の作製

### (1) ジスルフィド安定化抗体の作製

ジスルフィド安定化抗体は、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA あるいはヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA のそれぞれの適切な位置の 1 アミノ酸残基に相当する DNA 配列をシステイン残基に相当する DNA 配列に改変し、発現および精製したのち、ジスルフィド結合を形成させることで作製することができる。アミノ酸残基のシステイン残基への改変は前記 2 (5) の PCR を用いた変異導入法により行うことができる。

得られた改変 VH および改変 VL をコードする cDNA を適切な発現用ベクターに挿入することによりジスルフィド安定化抗体 H 鎖発現ベクターおよびジスルフィド安定化抗体 L 鎖発現ベクターを構築することができる。ここで用いるジスルフィド安定化抗体発現用ベクターとしては改変 VH および改変 VL をコードする cDNA を組み込み発現できるものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990) ]、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J.Biochem.), 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [ジーン(Gene), 27, 223(1984) ]、pKCR [プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc.Natl.Acad.Sci.), 78, 1527(1981) ]、pSG1  $\beta$  d2-4[サイトテクノロジー(Cytotechnology), 4, 173 (1990) ] 等があげられる。ジスルフィド安定化抗体を形成させるためにジスルフィド安定化抗体 L 鎖発現ベクターおよびジスルフィド安定化抗体 H 鎖発現ベクターを発現させるための宿主としては、大腸菌、酵母、動物細胞等の中から適切なものを選択することができるが、その場合の発現用ベクターとしては、それぞれの宿主に適切なものを選択する必要がある。また、適切なシグナルペプチドをコードする cDNA を発現用ベクターに挿入することでジスルフィド安定化抗体を細胞外に分泌させ、ペリプラズマ領域に輸送させ、あるいは細胞内に留まらせることができる。

## (2) ジスルフィド安定化抗体の発現、活性評価

前記 4 (1) で構築されたジスルフィド安定化抗体 H 鎖発現ベクターあるいはジスルフィド安定化抗体 L 鎖発現ベクターをエレクトロポレーション法 [特開平 2-257891、サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133 (1990) ] 等の方法により宿主細胞へ導入することにより、目的のジスルフィド安定化抗体 H 鎖あるいはジスルフィド安定化抗体 L 鎖を生産する形質転換株を取得することができる。発現ベクターの導入後、培養上清等に含まれるジスルフィド安定化抗体 H 鎖あるいはジスルフィド安定化抗体 L 鎖の発現は前記 1 (5) に記載の方法等

により確認することができる。

ジスルフィド安定化抗体 H 鎖あるいはジスルフィド安定化抗体 L 鎖の回収および精製は公知の技術を組み合わせることにより達成することができる。例えば、ジスルフィド安定化抗体 H 鎖あるいはジスルフィド安定化抗体 L 鎖が培地中に分泌されるならば、限外濾過により濃縮することができ、次いで各種クロマトグラフィーあるいはゲル濾過を実行することにより達成することができる。また、宿主細胞のペリプラズマ領域へと輸送されるならば、その細胞に浸透圧ショックを与え、限外濾過により濃縮することができ、次いで各種クロマトグラフィーあるいはゲル濾過を実行することにより達成することができる。不溶性であり、かつ顆粒（インクルージョン・ボディー）として存在しているジスルフィド安定化抗体 H 鎖あるいはジスルフィド安定化抗体 L 鎖は、細胞の溶解、顆粒を単離するための遠心分離と洗浄の繰り返し、例えばグアニジン-塩酸による可溶化後、各種クロマトグラフィーあるいはゲル濾過を実行することにより達成することができる。

そして、精製されたジスルフィド安定化抗体 H 鎖とジスルフィド安定化抗体 L 鎖を混合し、活性を有する構造へと導く操作 [refolding 操作, モレキュラー・イムノロジー (Molecular Immunology), 32, 249 (1995)] によりジスルフィド結合を形成させた後、抗原アフィニティークロマトグラフィーもしくはイオン交換クロマトグラフィーまたはゲルろ過により活性を有するジスルフィド安定化抗体を精製することができる。ジスルフィド安定化抗体の活性は前記 1 (5) に記載の方法等により測定することができる。

### (3) ジスルフィド安定化抗体の使用法

本発明のジスルフィド安定化抗体はヒト VEGF 受容体 KDR と特異的に結合し、KDR の作用を中和する。このため、本発明により提供されるジスルフィド安定化抗体は、固形腫瘍の増殖もしくは転移形成、慢性関節リウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、乾癬など過剰な VEGF 産生による血管新

生の異常により病態が進行する疾患においてその治療等に有用であると考えられる。本発明のジスルフィド安定化抗体は単独でまたは少なくとも 1 種以上の製剤上許容される補助剤と共に用いることができる。例えば、一本鎖抗体またはジスルフィド安定化抗体を、生理食塩水やグルコース、ラクトース、マンニトール等の水溶液に溶解して適当な医薬組成物とする。または、ジスルフィド安定化抗体を常法に従って凍結乾燥し、これに塩化ナトリウムを加えることによって粉末注射剤を作製する。本医薬組成物は必要に応じ、製剤分野で周知の添加剤、例えば、製剤上許容される塩等を含有することができる。

本医薬組成物の投与量は、患者の年齢、症状等によって異なるが、ヒトを含む哺乳動物に対し、ジスルフィド安定化抗体を 0.1～20mg/kg/日投与する。投与は、1 日 1 回（単回投与または連日投与）または間歇的に 1 週間に 1～3 回、2、3 週間に 1 回静脈注射により行う。

#### 5. 抗ヒト VEGF 受容体 KDR 抗体を用いたヒト VEGF 受容体 KDR の検出および定量方法

また、本発明は、本発明の抗体を用いて、ヒト VEGF 受容体 KDR またはヒト VEGF 受容体 KDR を細胞表面に発現した細胞を免疫学的に検出および定量する方法、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR を免疫学的に検出および定量する方法、ヒト VEGF とヒト VEGF 受容体 KDR との結合を阻害する方法およびヒト VEGF 受容体 KDR 作用を中和する方法に関する。

本発明のモノクローナル抗体を用いて、ヒト VEGF 受容体 KDR、ヒト VEGF 受容体 KDR を細胞表面に発現した細胞または可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR を免疫学的に検出および定量する方法としては、蛍光抗体法、免疫酵素抗体法（ELISA）、放射性物質標識免疫抗体法（RIA）、免疫組織染色法、免疫細胞染色法などの免疫組織化学染色法（ABC 法、CSA 法等）、ウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、上記に記した酵素免疫測定法、サンドイッチ ELISA 法〔単クローン抗体実験マニュアル（講談社サイエンティフィック、1987 年）、続生

化学実験講座 5 免疫生化学研究法（東京化学同人、1986 年）] などがあげられる。

蛍光抗体法とは、分離した細胞あるいは組織などに、本発明のモノクローナル抗体を反応させ、さらにフルオレシニン・イソチオシアネート（FITC）などの蛍光物質でラベルした抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、蛍光色素をフローサイトメーターで測定する方法である。

免疫酵素抗体法（ELISA）とは、分離した、細胞あるいはその破砕液、組織あるいはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などに、本発明の抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識などを施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、発色色素を吸光光度計で測定する方法である。

放射性物質標識免疫抗体法（RIA）とは、分離した、細胞あるいはその破砕液、組織あるいはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などに、本発明の抗体を反応させ、さらに放射線標識を施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、シンチレーションカウンタなどで測定する方法である。

免疫細胞染色法、免疫組織染色法とは、分離した、細胞あるいは組織などに、本発明の抗体を反応させ、さらにフルオレシニン・イソチオシアネート（FITC）などの蛍光物質、ペルオキシダーゼ、ビオチンなどの酵素標識を施した抗イムノグロブリン抗体あるいは結合断片を反応させた後、顕微鏡を用いて観察する方法である。

また、固形腫瘍の増殖もしくは転移形成に基づく疾患、異常な血管新生により病態が進行する疾患の診断方法としては、被験者の細胞あるいは組織に存在するヒト VEGF 受容体 KDR を、上述した免疫学的に検出または定量する方法があげられる。また、本発明のモノクローナル抗体は、固形腫瘍の増殖もしくは転移形成に基づく疾患、異常な血管新生により病態が進行する疾患の診断薬と

して用いることができる。

また、ヒト VEGF とヒト VEGF 受容体 KDR との結合の阻害活性は、増殖因子と受容体の結合測定法〔新生化学実験講座 7 増殖分化因子とその受容体（東京化学同人、1991 年）〕等の方法に準じて、本発明の抗体を用いた VEGF-VEGF 受容体 KDR 結合阻害試験を行うことにより確認することができる。

すなわち、KDR を発現している細胞あるいは組織に放射性物質等を標識した VEGF を反応させ、KDR 発現細胞あるいは組織に結合した VEGF をシンチレーションカウンターなどで測定する方法である。放射性物質等を標識した VEGF と同時に本発明の抗体を反応させることで、放射性物質等を標識した VEGF が KDR に結合するのを阻害する活性を測定することが可能である。

VEGF 受容体 KDR の自己リン酸化阻害活性は、増殖因子受容体の自己リン酸化測定法〔続生化学実験講座 情報伝達と細胞応答（東京化学同人、1986 年）〕等の方法に準じて、モノクローナル抗体を用いた、VEGF-VEGF 受容体 KDR の自己リン酸化阻害試験を行うことにより確認することができる。

すなわち、KDR を発現している細胞あるいは組織に VEGF を反応させ、VEGF が結合することで亢進する KDR の自己リン酸化を免疫沈降法およびウエスタンブロット法などで検出する方法である。VEGF と同時に本発明の抗体を反応させることで、VEGF が結合することにより亢進される KDR の自己リン酸化を阻害する活性を測定することが可能である。

ヒト VEGF の生物活性の阻害活性は、VEGF 依存的な血管内皮細胞の増殖、遊走、およびチューブ形成試験〔新生化学実験講座 10 血管（内皮と平滑筋）（東京化学同人、1991 年）〕を行うことにより確認することができる。

VEGF 依存的な血管内皮細胞の増殖試験とは、血管内皮細胞に VEGF を反応させ、VEGF が結合することで亢進する血管内皮細胞の増殖促進活性を細胞数を測定する方法である。VEGF と同時に本発明の抗体を反応させることで、VEGF により亢進する血管内皮細胞の増殖促進活性を阻害する活性を測定することが



可能である。

VEGF 依存的な血管内皮細胞の遊走試験とは、血管内皮細胞に VEGF を反応させ、VEGF が結合することで亢進する血管内皮細胞の遊走促進活性を顕微鏡を用いて観察する方法である。VEGF と同時に本発明の抗体を反応させることで、VEGF により亢進する血管内皮細胞の遊走促進活性を阻害する活性を測定することが可能である。

VEGF 依存的な血管内皮細胞のチューブ形成試験とは、血管内皮細胞に VEGF を反応させ、VEGF が結合することで亢進する血管内皮細胞のチューブ形成促進活性を顕微鏡を用いて観察する方法である。VEGF と同時に本発明の抗体を反応させることで、VEGF により亢進する血管内皮細胞のチューブ形成促進活性を阻害する活性を測定することが可能である。

さらに、本発明は本発明の抗体を用いることを特徴とする、血管新生異常疾患の診断方法あるいは治療方法、本発明の抗体を有効成分とする、血管新生異常疾患の診断薬あるいは治療薬に関する。

血管新生異常疾患とは、固形腫瘍の増殖もしくは転移形成、慢性関節リウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、乾癬など、過剰な VEGF で起こりうる血管新生の異常により病態が進行する疾患を示す。

血管新生異常疾患の診断方法としては、被験者の細胞あるいは組織に存在するヒト VEGF 受容体 KDR を免疫学的に検出または定量する方法があげられる。

また、本発明の抗体は、血管新生異常疾患の診断薬として用いることができる。

さらに、本発明の抗体はヒト VEGF の生物活性を阻害できるため、ヒト VEGF の KDR への結合を阻害することで、KDR 自己リン酸化を阻害した結果、VEGF 依存的ヒト血管内皮細胞の増殖を阻害できるため、血管新生異常疾患の治療薬として用いることができる。

#### 図面の簡単な説明

第1図 プラスミド pVL-KDR-7N-Fc の造成工程を示した図である。

第2図 可溶性 KDR-Fc 各種誘導体の模式図である。

第3図 可溶性 KDR 各種誘導体の模式図である。

第4図 精製した可溶性 KDR-Fc 各種誘導体の SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (5 ~20% グラジエントゲルを使用) のパターンを示した図である。左より、KDR-1N-Fc、KDR-2N-Fc、KDR-3N-Fc、KDR-4N-Fc、KDR-5N-Fc、KDR-7N-Fc、KDR-2 $\Delta$ 1N-Fc、KDR-4 $\Delta$ 1N-Fc、KDR-5 $\Delta$ 1N-Fc の泳動パターンをそれぞれ示す。還元条件下で電気泳動を行った。

第5図 はプレートコートした可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7N-Fc への  $^{125}\text{I}$ -ヒト VEGF の結合に及ぼす可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体の阻害効果を解析した結果を示す。B.はプレートコートした可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体への  $^{125}\text{I}$ -ヒト VEGF の結合を解析した結果を示す。

第6図 ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体の可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体への結合活性を解析した結果を示す。

第7図 ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体のエピトープ部位を示す。

第8図 ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体の可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体への結合活性を解析した結果を示す。

第9図 ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体による VEGF と可溶性 VEGF 受容体 KDR-7N-Fc および可溶性 VEGF 受容体 Flt-1 7N の結合阻害効果を解析した結果を示す。

第10図 ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体による KDR 自己リン酸化阻害活性を検討した結果を示す。

第11図 ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体による VEGF 依存的な血管内皮細胞の増殖阻害活性を検討した結果を示す。

第12図 ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体のヒト VEGF 受容体 KDR 発現細胞 NIH3T3-Flt-1、コントロール細胞 NIH3T3-Neo 細胞、HUVEC および

HMVEC との反応性をフローサイトメーターにて解析した結果を示す。

第 13 図 ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体の HUVEC および HMVEC との反応性をフローサイトメーターにて解析した結果を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

##### 実施例 1

##### 1. 抗原の調製

抗原として可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体および可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 各種誘導体を以下のようにして調製した。

##### (1)可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクターの構築

ヒト VEGF 受容体 KDR のシグナルペプチドを構成する配列番号 27 記載の 19 アミノ酸及び成熟体ヒト VEGF 受容体 KDR である、配列番号 26 記載のアミノ酸配列 1～738 番目に相当する可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 断片、6 アミノ酸残基からなるリンカー（リンカー #1）及びヒト抗体 Fc 領域を構成する 227 アミノ酸から成る融合タンパク質（以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7N-Fc と称す）を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7N-Fc は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域の N 末端側から 7 個のイムノグロブリン様部位及び 6 アミノ酸残基からなるリンカー（リンカー #1）及びヒト抗体 Fc 領域から成る融合タンパク質に相当する。

ヒト VEGF 受容体 KDR の完全長 cDNA をコードする cDNA クローン BCMGS-neo-KDR(A. Sawano ら ; Cell Growth & Differentiation 7, 213-221, 1996)を EcoRI で切断し、KDR の細胞外領域及び膜結合領域をコードする約 2.8 kb の断片を pUC18 の EcoRI 部位に組み込むことによって、pUC-KDR を作製した。pUC-KDR を XhoI で切断し、Klenow 処理後、XbaI リンカー（配列番号 1）を挿入することによって pUC-KDR-Xb を作製した。pUC-KDR-Xb の XbaI-BamHI (2.3 kbp) 断片を pBluescriptII KS(+)の XbaI/BamHI 部位に挿入した後、SphI-BamHI (5.2

kbp)断片を調製し、SnaBI 部位を含む合成リンカー (配列番号 2 及び配列番号 3) を挿入し、pBS-KDR-Xb-S を作製した。pBS-KDR-Xb-S の XbaI/SnaBI (2.3 kbp) 断片、プラスミド pAMoPRFc [T. Yago ら ; The Journal of Immunology 158 ,707-714(1997)] 上のヒト抗体の Fc 領域をコードする SnaBI/NotI (0.7 kbp) 断片をバキュロウイルス組み換え pVL1393 プラスミドのポリヘドリン (Polyhedrin) 遺伝子の転写開始点の下流 5'側 XbaI 及び 3'側 NotI 部位に組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクター pVL-KDR-7N-Fc を構築した (第 1 図)。

#### (2)可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-6N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクターの構築

ヒト VEGF 受容体 KDR のシグナルペプチドを構成する配列番号 27 記載の 19 アミノ酸及び成熟体ヒト VEGF 受容体 KDR である、配列番号 26 記載のアミノ酸配列 1 ~638 番目に相当する可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 断片、6 アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー #1) 及びヒト抗体 Fc 領域を構成する 227 アミノ酸から成る融合タンパク質 (以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-6N-Fc と称す) を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-6N-Fc は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域の N 末端側から 6 個のイムノグロブリン様部位及び 6 アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー #1) 及びヒト抗体 Fc 領域から成る融合タンパク質に相当する。

配列番号 4 及び配列番号 5 に示した塩基配列を有するプライマー 10 pmol、pBS-KDR-Xb-S (抗原の調製(1)参照) DNA 10ng、及び、10mM デオキシヌクレオチド三リン酸 (deoxynucleotide triphosphates) を含む 10mM MgCl<sub>2</sub>、0.001% (W/V) ゼラチン溶液 100  $\mu$ l に 2.5 units Taq ポリメラーゼを加えた。反応は 95℃で 5 分間の前処理した後、95℃で 90 秒間、50℃で 90 秒間、最後に 72℃で 90 秒間のポリメラーゼ・チェイン・リアクション (PCR) を 30 回繰り返す、DNA 断片を回収した。本 DNA 断片を EcoT22I と SnaBI で切断し、80 bp の EcoT22I/SnaBI

断片を得た。本 DNA 断片及び pBS-KDR-Xb-S（抗原の調製(1)参照）の EcoT22I/SnaBI（5.2 kbp）断片を連結させ pBS-KDR(6N)L を作製した。pBS-KDR(6N)L の XbaI/SnaBI（2.0 kbp）及び pAMoPRFc（抗原の調製(1)参照）上のヒト抗体の Fc 領域をコードする SnaBI/NotI（0.7 kbp）をバキュロウイルス組み換え pVL1393 プラスミドのポリヘドリン（Polyhedrin）遺伝子の転写開始点の下流 5'側 XbaI 及び 3'側 NotI 部位に組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-6N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクター pVL-KDR-6N-Fc を構築した。

(3)可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-5N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクターの構築

ヒト VEGF 受容体 KDR のシグナルペプチドを構成する配列番号 27 記載の 19 アミノ酸及び成熟体ヒト VEGF 受容体 KDR である、配列番号 26 記載のアミノ酸配列 1～518 番目に相当する可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 断片、6 アミノ酸残基からなるリンカー（リンカー #1）及びヒト抗体 Fc 領域を構成する 227 アミノ酸から成る融合タンパク質（以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-5N-Fc と称す）を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-5N-Fc は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域の N 末端側から 5 個のイムノグロブリン様部位及び 6 アミノ酸残基からなるリンカー（リンカー #1）及びヒト抗体 Fc 領域から成る融合タンパク質に相当する。

pUC-KDR-Xb の EcoRI/HincII（1.9 kbp）断片及び配列番号 6 及び配列番号 7 の塩基配列を有する合成リンカーをベクター pBluescriptII SK(-)の EcoRI/NotI 部位に挿入し、pBS-KDR-5N を構築した。pBS-KDR-5N の XbaI/SnaBI（1.9 kbp）断片及び pAMoPRFc（抗原の調製(1)参照）上のヒト抗体の Fc 領域をコードする SnaBI/NotI（0.7 kbp）をバキュロウイルス組み換え pVL1393 プラスミドのポリヘドリン（Polyhedrin）遺伝子の転写開始点の下流 5'側 XbaI 及び 3'側 NotI 部位に組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-5N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクター pVL-KDR-5N-Fc を構築した。

#### (4)可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-4N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクターの構築

ヒト VEGF 受容体 KDR のシグナルペプチドを構成する配列番号 27 記載の 19 アミノ酸及び成熟体ヒト VEGF 受容体 KDR である、配列番号 26 記載のアミノ酸配列 1～393 番目に相当する可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 断片、2 アミノ酸残基からなるリンカー（リンカー#2）及びヒト抗体 Fc 領域を構成する 227 アミノ酸から成る融合タンパク質（以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-4N-Fc と称す）を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-4N-Fc は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域の N 末端側から 4 個のイムノグロブリン様部位及び 2 アミノ酸残基からなるリンカー（リンカー#2）及びヒト抗体 Fc 領域から成る融合タンパク質に相当する。

配列番号 8 および配列番号 9 に示した塩基配列を有するプライマー 10 pmol、pUC-KDR-Xb DNA 10 ng、及び、10 mM デオキシヌクレオチド三リン酸（deoxynucleotide triphosphates）を含む 10 mM MgCl<sub>2</sub>、0.001% (W/V)ゼラチン溶液 100  $\mu$ l に 2.5 units Taq ポリメラーゼを加えた。反応は 95℃で 5 分間の前処理した後に、95℃で 90 秒間、50℃で 90 秒間、最後に 72℃で 90 秒間のポリメラーゼ・チェイン・リアクション（PCR）を 30 回繰り返す、DNA 断片を回収した。この DNA 断片を HindIII と KpnI により切断し、520 bp の HindIII-KpnI DNA 断片を得た。本 DNA 断片と、pAMoPRFc 上のヒト抗体の Fc 領域をコードする KpnI/NotI（0.7 kbp）断片とをベクター pAMoPRFc（抗原の調製(1)参照）の HindIII/NotI 部位に挿入し、pAMo-4N-Fc を構築した。pAMo-4N-Fc の HindIII/NotI（1 kbp）及び pUC-KDR-Xb の XbaI/HindIII（0.7 kbp）をバキュロウイルス組み換え pVL1393 プラスミドのポリヘドリン（Polyhedrin）遺伝子の転写開始点の下流 5'側 XbaI 及び 3'側 NotI 部位に組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-4N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクター pVL-KDR-4N-Fc を構築した。

#### (5)可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-3N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベ

## クターの構築

ヒト VEGF 受容体 KDR のシグナルペプチドを構成する配列番号 27 記載の 19 アミノ酸及び成熟体ヒト VEGF 受容体 KDR である、配列番号 26 記載のアミノ酸配列 1～294 番目に相当する可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 断片、6 アミノ酸残基からなるリンカー（リンカー#1）及びヒト抗体 Fc 領域を構成する 227 アミノ酸から成る融合タンパク質（以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-3N-Fc と称す）を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-3N-Fc は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域の N 末端側から 3 個のイムノグロブリン様部位及び 6 アミノ酸残基からなるリンカー（リンカー#1）及びヒト抗体 Fc 領域から成る融合タンパク質に相当する。

pUC-KDR-Xb（抗原の調製(1)参照）の EcoRI/EcoT14I（1.2 kbp）断片及び配列番号 10 及び配列番号 11 の塩基配列を有する合成リンカーを pBluescriptII SK(-) の EcoRI/NotI 部位に挿入し、pBS-KDR-3N を構築した。pBS-KDR-3N の XbaI/SnaBI（1.2 kbp）断片及び pAMoPRFc（抗原の調製(1)参照）上のヒト抗体の Fc 領域をコードする SnaBI/NotI（0.7 kbp）断片をバキュロウイルス組み換え pVL1393 プラスミドのポリヘドリン（Polyhedrin）遺伝子の転写開始点の下流 5' 側 XbaI 及び 3' 側 NotI 部位に組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-3N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクター pVL-KDR-3N-Fc を構築した。

## (6)可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-2N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクターの構築

ヒト VEGF 受容体 KDR のシグナルペプチドを構成する配列番号 27 記載の 19 アミノ酸及び成熟体ヒト VEGF 受容体 KDR である、配列番号 26 記載のアミノ酸配列 1～194 番目に相当する可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 断片、6 アミノ酸残基からなるリンカー（リンカー#1）及びヒト抗体 Fc 領域を構成する 227 アミノ酸から成る融合タンパク質（以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-2N-Fc と称す）を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF

受容体 KDR-2N-Fc は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域の N 末端側から 2 個のイムノグロブリン様部位及び 6 アミノ酸残基からなるリンカー（リンカー #1）及びヒト抗体 Fc 領域から成る融合タンパク質に相当する。

pUC-KDR-Xb（抗原の調製(1)参照）の EcoRI/VspI（0.9 kbp）断片及び配列番号 12 及び配列番号 13 の塩基配列を有する合成リンカーを pBluescriptII SK(-)の EcoRI/NotI 部位に挿入し、pBS-KDR-2N を構築した。pBS-KDR-2N の XbaI/SnaBI（0.9 kbp）断片及び pAMoPRFc（抗原の調製(1)参照）上のヒト抗体の Fc 領域をコードする SnaBI/NotI（0.7 kbp）をバキュロウイルス組み換え pVL1393 プラスミドのポリヘドリン（Polyhedrin）遺伝子の転写開始点の下流 5'側 XbaI 及び 3'側 NotI 部位に組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-2N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクター pVL-KDR-2N-Fc を構築した。

(7)可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-1N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクターの構築

ヒト VEGF 受容体 KDR のシグナルペプチドを構成する配列番号 27 記載の 19 アミノ酸及び成熟体ヒト VEGF 受容体 KDR である、配列番号 26 記載のアミノ酸配列 1～104 番目に相当する可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 断片、6 アミノ酸残基からなるリンカー（リンカー #1）及びヒト抗体 Fc 領域を構成する 227 アミノ酸から成る融合タンパク質（以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-1N-Fc と称す）を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-1N-Fc は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域の N 末端側から 1 個のイムノグロブリン様部位及び 6 アミノ酸残基からなるリンカー（リンカー #1）及びヒト抗体 Fc 領域から成る融合タンパク質に相当する。

pBS-KDR-2N（抗原の調製(6)参照）の BglII/NotI（2.8 kbp）断片に、配列番号 14 及び配列番号 15 の塩基配列を有する合成リンカーを連結し、pBS-KDR-1N を構築した。pBS-KDR-1N の XbaI/SnaBI（0.4 kbp）断片及び pAMoAPRFc（抗原の調製(1)参照）上のヒト抗体の Fc 領域をコードする SnaBI/NotI（0.7 kbp）をバキ



ユロウイルス組み換え pVL1393 プラスミドのポリヘドリン (Polyhedrin) 遺伝子の転写開始点の下流 5'側 XbaI 及び 3'側 NotI 部位に組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-1N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクター pVL-KDR-1N-Fc を構築した。

(8)可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7D1N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクターの構築

可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7N-Fc (抗原の調製(1)参照) から、N 末端側から 1 番目のイムノグロブリン様部位を形成する 31 番目のアミノ酸から 102 番目のアミノ酸までの計 72 個のアミノ酸を欠失させた KDR 断片、6 アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー #1) 及びヒト抗体 Fc 領域を構成する 227 アミノ酸から成る融合タンパク質 (以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7  $\Delta$ 1N-Fc と称す) を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7D1N-Fc は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域の N 末端側から 2~7 番目のイムノグロブリン様部位及び 6 アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー #1) 及びヒト抗体 Fc 領域から成る融合タンパク質に相当する。

配列番号 16 及び配列番号 17 に示した塩基配列を有するプライマー 10 pmol、pVL-KDR-7N (抗原の調製(14)参照) DNA 10 ng、及び、10 mM デオキシヌクレオチド三リン酸 (deoxynucleotide triphosphates) を含む 10 mM MgCl<sub>2</sub>、0.001% (W/V) ゼラチン溶液 100  $\mu$ l に 2.5 units Taq ポリメラーゼを加えた。反応は 95°C で 5 分間の前処理した後、95°C で 90 秒間、50°C で 90 秒間、最後に 72°C で 90 秒間のポリメラーゼ・チェイン・リアクション (PCR) を 30 回繰り返す、DNA 断片を回収した。本 DNA 断片を XbaI と BglII で切断し、0.8 kbp の XbaI/BglII 断片を得た。本 DNA 断片及び pVL-KDR-5N (抗原の調製(17)参照) の BglII/NotI (1.6 kbp) 断片を pBluescriptII SK(-) の XbaI/NotI に挿入し、pBS-KDR-5  $\Delta$ 1N を作製した。pBS-KDR-5  $\Delta$ 1N の XbaI/HincII (1.6 kbp) 断片及び pVL-KDR-7N-Fc (抗原の調製(1)参照) の HincII/NotI (1.2 kbp) をバキュロウイルス組み換え pVL1393 プラ

スミドのポリヘドリン (Polyhedrin) 遺伝子の転写開始点の下流 5'側 XbaI 及び 3'側 NotI 部位に組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7D1N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクター pVL-KDR-7  $\Delta$ 1N-Fc を構築した。

(9)可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-5  $\Delta$ 1N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクターの構築

可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-5N-Fc (抗原の調製(3)参照) から、N 末端側から 1 番目のイムノグロブリン様部位を形成する 31 番目のアミノ酸から 102 番目のアミノ酸までの計 72 個のアミノ酸を欠失させた KDR 断片、6 アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー #1) 及びヒト抗体 Fc 領域を構成する 227 アミノ酸から成る融合タンパク質 (以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-5  $\Delta$ 1N-Fc と称す) を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-5  $\Delta$ 1N-Fc は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域の N 末端側から 2~5 番目のイムノグロブリン様部位及び 6 アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー #1) 及びヒト抗体 Fc 領域から成る融合タンパク質に相当する。

pBS-KDR-5D1N (抗原の調製(8)参照) の XbaI/NotI (1.4 kbp) 断片及び pAMoAPRFc (抗原の調製(1)参照) 上のヒト抗体の Fc 領域をコードする SnaBI/NotI (0.7 kbp) をバキュロウイルス組み換え pVL1393 プラスミドのポリヘドリン (Polyhedrin) 遺伝子の転写開始点の下流 5'側 XbaI 及び 3'側 NotI 部位に組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-5  $\Delta$ 1N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクター pVL-KDR-5  $\Delta$ 1N-Fc を構築した。

(10)可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-4  $\Delta$ 1N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクターの構築

可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-4N-Fc (抗原の調製(4)参照) から、N 末端側から 1 番目のイムノグロブリン様部位を形成する 31 番目のアミノ酸から 102 番目のアミノ酸までの計 72 個のアミノ酸を欠失させた KDR 断片、6 アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー #2) 及びヒト抗体 Fc 領域を構成する 227 アミノ酸

から成る融合タンパク質(以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-4D1N-Fc と称す)を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-4  $\Delta$ 1N-Fc は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域の N 末端側から 2~4 番目のイムノグロブリン様部位及び 2 アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー #2) 及びヒト抗体 Fc 領域から成る融合タンパク質に相当する。

抗原の調製(8)で回収した XbaI/BglII-PCR 断片 (0.8 kbp) 及び pVL-KDR-4N (抗原の調製(18)参照) の BglII/NotI (0.9 kbp) 断片を pBluescriptII SK(-)の XbaI/NotI に挿入し、pBS-KDR-4  $\Delta$ 1N を作製した。pBS-KDR-4  $\Delta$ 1N の XbaI/KpnI (1.0 kbp) 断片及び pAMoAPRFc (抗原の調製(1)参照) 上のヒト抗体の Fc 領域をコードする SnaBI/NotI (0.7 kbp) をバキュロウイルス組み換え pVL1393 プラスミドのポリヘドリン (Polyhedrin) 遺伝子の転写開始点の下流 5'側 XbaI 及び 3'側 NotI 部位に組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-4  $\Delta$ 1N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクター pVL-KDR-4  $\Delta$ 1N-Fc を構築した。

#### (11)可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7N 発現ベクターの構築

ヒト VEGF 受容体 KDR のシグナルペプチドを構成する配列番号 27 記載の 19 アミノ酸及び成熟体ヒト VEGF 受容体 KDR である、配列番号 26 記載のアミノ酸配列 1~738 番目に相当する可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 断片 (以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7N と称す) 及びリンカー由来の 2 アミノ酸残基を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7N は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域の N 末端側から 7 個のイムノグロブリン様部位に相当する。

pBS-KDR-Xb-S (抗原の調製(1)参照) を SnaBI/BamHI で切断し、終止コドンと NotI 部位とを含む合成リンカー (配列番号 18 及び配列番号 19) を組み込み、pBS-KDR(Xb)-S-N を作製した。pBS-KDR-Xb-S-N の XbaI-NotI (2.3 kb) 断片をバキュロウイルス組み換え pVL1393 プラスミドのポリヘドリン (Polyhedrin) 遺伝子の転写開始点の下流 5'側 XbaI 及び 3'側 NotI 部位に組み込み、可溶性ヒト

VEGF 受容体 KDR-7N 発現ベクター pVL-KDR-7N を作製した。

(12) 可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7N' 発現ベクターの構築

ヒト VEGF 受容体 KDR のシグナルペプチドを構成する配列番号 27 記載の 19 アミノ酸及び成熟体ヒト VEGF 受容体 KDR である、配列番号 26 記載のアミノ酸配列 1～714 番目に相当する可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 断片（以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7N' と称す）を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7N' は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域の N 末端側から 7 個目のイムノグロブリン様部位の約 2/3 までに相当する。

pUC-KDR-Xb を *Stu*I 及び *Sph*I で切断し、終止コドン及び *Not*I 部位を含む合成リンカー（配列番号 23 及び配列番号 21）を挿入した。XbaI-*Not*I (2.2 kbp) 断片をバキュロウイルス組み換え pVL1393 プラスミドのポリヘドリン (Polyhedrin) 遺伝子の転写開始点の下流 5'側 XbaI 及び 3'側 *Not*I 部位に組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7N' 発現ベクター pVL-KDR-7N' を作製した。

(13) 可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-5N 発現ベクターの構築

ヒト VEGF 受容体 KDR のシグナルペプチドを構成する配列番号 27 記載の 19 アミノ酸及び成熟体ヒト VEGF 受容体 KDR である、配列番号 26 記載のアミノ酸配列 1～518 番目に相当する可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 断片（以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-5N と称す）を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-5N は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域の N 末端側から 5 個のイムノグロブリン様部位に相当する。

pUC-KDR-Xb の *Eco*RI-*Hinc*II (1.9 kb) 断片及び *Sna*BI 部位、終止コドン、*Not*I 部位を含む合成 DNA（配列番号 22 及び配列番号 23）を pBluescriptII SK(-)の *Eco*RI/*Not*I 部位に挿入し、pBS-KDR-5N を作製した。pBS-KDR-5N の XbaI-*Not*I (1.6 kb) 断片をバキュロウイルス組み換え pVL1393 プラスミドのポリヘドリン (Polyhedrin) 遺伝子の転写開始点の下流 5'側 XbaI 及び 3'側 *Not*I 部位に組み込

み、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-5N 発現ベクター pVL-KDR-5N を作製した。

(14) 可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-4N 発現ベクターの構築

ヒト VEGF 受容体 KDR のシグナルペプチドを構成する配列番号 27 記載の 19 アミノ酸及び成熟体ヒト VEGF 受容体 KDR である、配列番号 26 記載のアミノ酸配列 1～393 番目に相当する可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 断片（以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-4N と称す）及びリンカー由来の 2 アミノ酸残基を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-4N は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域の N 末端側から 4 個のイムノグロブリン様部位に相当する。

pAMo-4N-Fc（抗原の調製(4)参照）の XbaI/KpnI（1.2 kb）断片及び配列番号 24 及び配列番号 25 の塩基配列を有する合成リンカーをバキュロウイルス組み換え pVL1393 プラスミドのポリヘドリン（Polyhedrin）遺伝子の転写開始点の下流 5'側 XbaI 及び 3'側 NotI 部位に組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-4N 発現ベクター pVL-KDR-4N を作製した。

(15) 可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-3N 発現ベクターの構築

ヒト VEGF 受容体 KDR のシグナルペプチドを構成する配列番号 27 記載の 19 アミノ酸及び成熟体ヒト VEGF 受容体 KDR である、配列番号 26 記載のアミノ酸配列 1～294 番目に相当する可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 断片（以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-3N と称す）及びリンカー由来の 2 アミノ酸残基を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-3N は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域の N 末端側から 3 個のイムノグロブリン様部位に相当する。

pBS-KDR-3N（抗原の調製(5)参照）の XbaI/SnaBI（1.2 kb）断片、配列番号 18 及び配列番号 19 の塩基配列を有する合成リンカーをバキュロウイルス組み換え pVL1393 プラスミドのポリヘドリン（Polyhedrin）遺伝子の転写開始点の下流 5'側 XbaI 及び 3'側 BglII 部位に組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-3N 発現

ベクターpVL-KDR-3N を作製した。

(16)可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7  $\Delta$ 1N 発現ベクターの構築

可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7N (抗原の調製(14)参照) から、N 末端側から 1 番目のイムノグロブリン様部位を形成する 31 番目のアミノ酸から 102 番目のアミノ酸までの計 72 個のアミノ酸を欠失させた KDR 断片、6 アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー #1) 及びヒト抗体 Fc 領域を構成する 227 アミノ酸から成る融合タンパク質 (以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7  $\Delta$ 1N と称す) を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7  $\Delta$ 1N は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域の N 末端側から 2 ～7 番目のイムノグロブリン様部位及び 6 アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー #1) から成る融合タンパク質に相当する。

pBS-KDR-5  $\Delta$ 1N (抗原の調製(9)参照) の XbaI/HincII (1.6 kbp) 断片及び pVL-KDR-7N (抗原の調製(14)参照) の HincII/NotI (0.67 kbp) 断片をバキュロウイルス組み換え pVL1393 プラスミドのポリヘドリン (Polyhedrin) 遺伝子の転写開始点の下流 5'側 XbaI 及び 3'側 NotI 部位に組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7 $\Delta$ 1N 発現ベクターpVL-KDR-7 $\Delta$ 1N を作製した。

(17)昆虫細胞による可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 発現を行うための組み換えウィルスの作製

昆虫細胞による蛋白質の生産には目的遺伝子を組み込んだ組み換えウィルスの作製が必要であるが、その作製にはトランスファーベクターと呼ばれる目的蛋白質をコードする cDNA を特殊なプラスミドに組み込む過程と野生型ウィルスとトランスファーベクターを昆虫細胞にコトランスフェクションし、相同組み換えにより組み換えウィルスを取得する過程を経る。以上の過程についてファーミンジェン社製バキュロゴールドスターターキット (製品番号 PM-21001K) を用いてそのマニュアルに従い以下の手順で行った。

TMX-FH インセクトメディウム (ファーミンジェン社製) にて培養した昆虫

細胞 Sf9 (ファーミンジェン社製) に線状バキュロウィルス DNA [バキュロゴールド・バキュロウィルス DNA(BaculoGold baculovirus DNA) 、ファーミンジェン社製] および作製したトランスファーベクターDNA をリポフェクチン法にて導入すること [蛋白質核酸酵素、37, 2701(1992)] により行い組み換えバキュロウィルスを以下のように作製した。

(1)で作製した発現ベクターの  $1 \mu\text{g}$  と線状バキュロウィルス DNA の  $20\text{ng}$  とを  $12 \mu\text{l}$  の蒸留水に溶解し、さらにリポフェクチン  $6 \mu\text{l}$  と蒸留水  $6 \mu\text{l}$  とを混和したものを加え室温で 15 分間放置した。一方 Sf9 細胞  $1 \times 10^6$  個を  $2\text{ml}$  の Sf900-II 培地 [ギブコ(Gibco) 社製] に懸濁し、直径  $35\text{mm}$  の細胞培養用プラスチックシャーレに入れた。ここに上記のプラスミド DNA、線状バキュロウィルス DNA およびリポフェクチン混和溶液全量を加え  $27^\circ\text{C}$  で 3 日間培養後、組み換えウィルスを含む培養上清  $1\text{ml}$  を採取した。シャーレには新たに Sf900-II 培地  $1\text{ml}$  を加え、さらに  $27^\circ\text{C}$  で 3 日間培養し組み換えウィルスを含む培養上清をさらに  $1.5\text{ml}$  得た。さらに、(2)～(16)で作製した発現ベクターを用い同様の操作を行った。

次に蛋白質発現に用いるために得られた組み換えウィルスを各々、以下の手順で増殖させた。

Sf9 細胞  $2 \times 10^7$  個を  $10\text{ml}$  の Sf900-II 培地に懸濁し、 $175\text{cm}^2$  フラスコ (グライナー社製) に入れて室温で 1 時間放置して細胞をフラスコに付着させた。放置後上清を除き新たに  $15\text{ml}$  の TMN-FH インセクトメディウムと上記の組み換えウィルスを含む培養上清のうち  $1\text{ml}$  を加え  $27^\circ\text{C}$  で 3 日間培養した。培養後上清を  $1,500 \times g$  で 10 分間遠心分離して細胞を除き、蛋白質発現に使用する組み換えウィルス溶液を得た。

得られた組み換えウィルス溶液についてウィルスの力価をバキュロゴールドスターターキット・マニュアル (ファーミンジェン社製) に記載の方法で算定した。

Sf9 細胞  $6 \times 10^6$  個を 4ml の Sf900-II 培地に懸濁し、直径 60mm の細胞培養用プラスチックシャーレに入れ、室温で 1 時間放置して細胞をシャーレに付着させた。次に上清を除き新たに Sf900-II 培地 400  $\mu$ l と Sf900-II 培地で 1000 倍に希釈した上記組み換えウィルス溶液を加え室温で 1 時間放置した後、培地を除き 5ml の 1%低融点アガロース [アガープレート・アガロース(Agarplaque Agarose)、ファーマーミンジェン社製] を含む培地 [滅菌した 1ml の 5%アガープレートプラス・アガロース水溶液と 4ml の TMN-FH インセクトメディウムを混和し、42℃に保温したもの] を該シャーレに流し込んだ。室温で 15 分間放置した後、乾燥を防ぐためビニルテープをシャーレにまき、密閉可能なプラスチック製容器に該シャーレを入れ、27℃で 6 日間培養した。該シャーレに 0.01% ニュートラルレッドを含む PBS 1ml を加えさらに 1 日培養した後、出現したプラークの数を数えた。以上の操作より該組み換えウィルス溶液はいずれも約  $1 \times 10^7$  プラークフォーミングユニット (以下、PFU と称す) /ml のウィルスを含んでいることがわかった。

(18) 昆虫細胞における可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体、および、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 各種誘導体の発現、精製

1 (1) ~ (16) で示した可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体、および、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 各種誘導体は以下のようにして得た。High Five 細胞  $4 \times 10^7$  個を 175cm<sup>2</sup> フラスコ(グライナー社製)中の EX-CELL™400 培地(JRH Bioscience 社製) 30ml に懸濁し、室温で 1 時間放置し、フラスコに付着させた。(1) ~ (16) で得られたトランスファーベクター由来の組み換えウィルスを約  $1 \sim 3 \times 10^8$  PFU /ml の濃度で含む溶液を 1ml 加え、室温で 2 時間感染させた。培養上清を除き新たに 30ml の EX-CELL™400 培地 30ml を加え 27℃にて 3~4 日間培養した。培養終了後、培養上清を回収し 1,500  $\times$ g で 10 分間遠心分離を行い上清を得た。

可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体については、プロセップ A カラ



ムを用いて以下のように精製した。

カラムに約 1ml のプロセップ A [Bioprocessing 社製] を充填し、10ml の 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.2) を用いて 1ml/分の流速でカラムを洗浄した。洗浄後、上記のように調整した可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR を含む培養液 500 ~1000ml を 100ml/時の流速でプロセップ A カラムに通塔した。さらに 10ml の 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.2) を用いて 1ml/分の流速で洗浄した後、50mM クエン酸緩衝液 (pH3) を 7ml 通塔し、プロセップ A カラムに吸着した蛋白質の溶出を行った。各分画に含まれる蛋白を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)にて解析した。

可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 各種誘導体については、以下のように精製した。

50ml の DEAE-Sepharose CL-6B(Pharmacia Biotech 社製)を充填したカラムが液の入口側に、40ml の Heparin Sepharose CL-6B(Pharmacia Biotech 社製)を充填したカラムが出口側になるように直列に接続し、300ml の 20mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH8)で洗浄した。洗浄後、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR を含む培養液 400 ~800ml を 50~100ml/時の流速で通塔した。更に、300ml の 20mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH8)で洗浄した後、Heparin Sepharose CL-6B カラムのみに 400ml の 0~1M NaCl/20mM リン酸ナトリウム緩衝液にて連続濃度勾配をかけ、吸着蛋白質の溶出を行った。溶出液は 7ml ずつ分画し、各分画に含まれる蛋白質を SDS-PAGE にて解析し、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR を含む分画を 60~80ml 回収した。回収した精製画分はセントリプレップ 10 (アミコン社製)を用いて濃縮し、可溶性ヒト KDR3N、KDR4N、KDR5N、KDR7N' および KDR7N を溶液としてそれぞれ 2.8ml、8ml、5.5ml、4ml および 4.8ml (蛋白質濃度/純度は 345.5  $\mu$ g/ml/30%、264  $\mu$ g/ml/50~60%、380.5  $\mu$ g/ml/70%、1.59mg/ml/60%および 815  $\mu$ g/ml/70~80%) 得た。

取得した可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体、および、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 各種誘導体の模式図は第 2 図および第 3 図に示した。

#### (19) 可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の純度の確認

精製可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc の純度を SDS-PAGE を用いて確認した。SDS-PAGE は文献記載の方法 [Anticancer Research, 12, 1121 (1992)] に従った。ゲルには 5~20% グラジエントゲル (アトー社製) を用い、還元条件下でレーンあたりのタンパク量として 2  $\mu$ g の KDR-Fc それぞれ泳動し、クーマシーブリーリアントブルーにて染色した。第 4 図に結果を示した。KDR-7N-Fc、KDR-5N-Fc、KDR-4N-Fc、KDR-3N-Fc、KDR-2N-Fc、KDR-1N-Fc、KDR-5 $\Delta$ 1N-Fc、KDR-4 $\Delta$ 1N-Fc の純度は 95% 以上であった。

#### (20) 対照抗原蛋白の精製

対照抗原蛋白は以下のようにして得た。High Five 細胞  $4 \times 10^7$  個を 175cm<sup>2</sup> フラスコ (グライナー社製) 中の EX-CELL<sup>TM</sup>400 培地 (JRH Bioscience 社製) 30ml に懸濁し、室温で 1 時間放置し、フラスコに付着させ、27℃にて 3~4 日間培養した。培養終了後、培養上清を回収し 1,500  $\times$ g で 10 分間遠心分離を行い上清を得た。カラムにヘパリン-セファロース CL-6B ゲル (Pharmacia Biotech AB 社製) 約 20ml を充填し、200ml の 20mM トリス-塩酸 (pH7.5) 緩衝液で 0.5ml/分の流速で洗浄した。洗浄後、上記のように調製した High Five 細胞の培養液 500ml を 0.5ml/分の流速でヘパリン-セファロース CL-6B カラムに通塔した。さらに 200ml の 0.2M NaCl を含む 20mM トリス-塩酸 (pH7.5) で 0.5ml/分の流速で洗浄した後、1M NaCl を含む 20mM トリス-塩酸 (pH7.5) からなる緩衝液を 200 ml 通塔し、ヘパリン-セファロースに吸着した蛋白質を溶出した。1M NaCl 溶出画分をセントリプレップ 10 (アミコン社製) を用いて濃縮し対照抗原蛋白を蛋白濃度 867  $\mu$ g/ml の溶液として 7 ml 得た。

#### (21) 可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体のヒト VEGF 結合活性の確認

(18) で取得した可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体 (KDR-7N-Fc, KDR-5N-Fc, KDR-4N-Fc, KDR-3N-Fc, KDR-2N-Fc, KDR-1N-Fc, KDR-5 $\Delta$ 1N-Fc,

KDR-4 $\Delta$ 1N-Fc, KDR-2 $\Delta$ 1N-Fc) のヒト VEGF 結合活性を以下の (21-1) VEGF 結合阻害試験、(21-2) VEGF 結合試験により確認した。

#### (21-1) VEGF 結合阻害試験

96 ウェル・イムオピロン™-P フィルトレーション・プレート (96-well Immobilon™-P Filtration Plate ; ミリポア社製) にメタノールを 100  $\mu$  l/ウェルで分注し、プレート底部の PVDF 膜を親水化した。水で洗浄後、PBS 希釈 4  $\mu$  g/ml 可溶性ヒト KDR-7N-Fc を 50  $\mu$  l/ウェルで分注し、4  $^{\circ}$ C で一晩放置して吸着させた。洗浄後、1 % 牛血清アルブミン(BSA) を含む PBS を 200  $\mu$  l / ウェル加え、室温 30 分間反応させて残っている活性基をブロックした。PBS で洗浄後、(18) で取得した精製可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体 (KDR-7N-Fc, KDR-5N-Fc, KDR-4N-Fc, KDR-3N-Fc, KDR-2N-Fc, KDR-1N-Fc, KDR-5 $\Delta$ 1N-Fc, KDR-4 $\Delta$ 1N-Fc, KDR-2 $\Delta$ 1N-Fc) を 50  $\mu$  l/ウェルで分注し (最終濃度 0.05~6.25  $\mu$  g/ml) 、さらに、 $^{125}$ I 標識ヒト VEGF (最終濃度 4ng/ml : アマシャム社製) を 50  $\mu$  l / ウェル加え、室温で 1.5 時間反応させた。0.05 % tween-PBS で洗浄後、50 $^{\circ}$ C にてウェルを乾燥させ、マイクロシンチ-0 (パッカーカード社製) を 10  $\mu$  l/ウェル加え、トップカウント (パッカーカード社製) を用いて、各ウェルに結合した  $^{125}$ I 標識ヒト VEGF の放射活性を測定した。

結果を第 5A 図に示す。KDR-7N-Fc, KDR-5 $\Delta$ 1N-Fc, KDR-5N-Fc, KDR-4 $\Delta$ 1N-Fc, KDR-4N-Fc は濃度依存的に  $^{125}$ I 標識ヒト VEGF の可溶性ヒト KDR7N-Fc への結合を阻害することが示された。一方、KDR-3N-Fc, KDR-2N-Fc, KDR-1N-Fc, KDR-2 $\Delta$ 1N-Fc は全く結合阻害活性を示さなかった。結合阻害活性の強さは、KDR-7N-Fc > KDR-5 $\Delta$ 1N-Fc > KDR-5N-Fc > KDR-4 $\Delta$ 1N-Fc > KDR-4N-Fc の順番であった。従って、VEGF の KDR への結合には、少なくとも N 末から 1 番目、6 番目、7 番目の Ig 様ドメインは関与しないことが示された。また、N 末から 2、3、4 番目の Ig 様ドメイン (N 末端アミノ酸から 103~393 番目) があれば VEGF に結合できることが示された。

## (21-2) VEGF 結合試験

96 ウェル・イムオビロン™-P フィルトレーション・プレート (96-well Immobilon™-P Filtration Plate ; ミリポア社製) にメタノールを 100  $\mu$  l/ウェルで分注し、プレート底部の PVDF 膜を親水化した。水で洗浄後、PBS 希釈した 0.1~12.5  $\mu$  g/ml の (18) で取得した精製可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体 (KDR-7N-Fc, KDR-5N-Fc, KDR-4N-Fc, KDR-3N-Fc, KDR-2N-Fc, KDR-1N-Fc, KDR-5 $\Delta$ 1N-Fc, KDR-4 $\Delta$ 1N-Fc, KDR-2 $\Delta$ 1N-Fc) を 50  $\mu$  l/ウェルで分注し、4  $^{\circ}$ C で一晩放置して吸着させた。洗浄後、1 % 牛血清アルブミン(BSA) を含む PBS を 200  $\mu$  l/ウェル加え、室温 3 分間反応させて残っている活性基をブロックした。PBS で洗浄後、 $^{125}$ I 標識ヒト VEGF (最終濃度 4ng/ml : アマシャム社製) を 50  $\mu$  l/ウェル加え、室温で 1.5 時間反応させた。0.05% tween-PBS で洗浄後、50 $^{\circ}$ C にてウェルを乾燥させ、マイクロシンチ-0 (パッカード社製) を 10  $\mu$  l/ウェル加え、トップカウント (パッカード社製) を用いて、各ウェルに結合した  $^{125}$ I 標識ヒト VEGF の放射活性を測定した。

結果を第 5B 図に示す。KDR-7N-Fc, KDR-5 $\Delta$ 1N-Fc, KDR-5N-Fc, KDR-4 $\Delta$ 1N-Fc, KDR-4N-Fc は濃度依存的に  $^{125}$ I 標識ヒト VEGF に結合することが示された。一方、KDR-3N-Fc, KDR-2N-Fc, KDR-1N-Fc, KDR-2 $\Delta$ 1N-Fc は全く結合活性を示さなかった。結合活性の強さは、KDR-7N-Fc > KDR-5 $\Delta$ 1N-Fc = KDR-5N-Fc > KDR-4 $\Delta$ 1N-Fc > KDR-4N-Fc の順番であった。従って、VEGF の KDR への結合には、少なくとも N 末から 1 番目、6 番目、7 番目の Ig 様ドメインは関与しないことが示された。また、N 末から 2、3、4 番目の Ig 様ドメイン (N 末端アミノ酸から 103 から 393 番目) があれば VEGF に結合できることが示された。

## (22) 昆虫細胞におけるヒト VEGF の発現

ヒト VEGF は以下のようにして得た。High Five 細胞  $4 \times 10^7$  個を 175cm<sup>2</sup> フラスコ (グライナー社製) に EX-CELL™400 培地 (JRH Bioscience 社製) 30ml に懸

濁し、室温で 1 時間放置し、フラスコに付着させた。文献 [セル・グロース・アンド・ディファレンシエーション(Cell Growth & Differentiation),7, 213,(1996)]

記載の方法により得られたヒト VEGF 組み換えバキュロウィルス溶液を約  $1 \sim 3 \times 10^8$  PFU/ml の濃度で含む溶液を 1ml 加え、室温で 2 時間感染させた。培養上清を除き新たに 30ml の EX-CELL™400 培地 30ml を加え 27℃にて 3~4 日間培養した。培養終了後、培養上清を回収し  $1,500 \times g$  で 10 分間遠心分離を行い上清を得た。

カラムに約 40ml のヘパリンーセファロース CL-6B ゲル [ファルマシア・バイオテック(Pharmacia Biotech) AB 社製] を充填し、400ml の 20mM トリスー塩酸 (pH7.5) からなる緩衝液を用いて 0.5ml/分の流速で洗浄した。洗浄後、上記のように調製したヒト VEGF を含む培養液 1500ml を 0.5ml/分の流速でヘパリンーセファロース CL-6B カラムに通塔した。さらに 400ml の 20mM トリスー塩酸 (pH7.5) を用いて 0.5ml/分の流速で洗浄した後、0.2M、0.5M および 1M の NaCl 含有 20mM トリスー塩酸 (pH7.5) からなる緩衝液各 120 ml を順次通塔し、ヘパリンーセファロースに吸着した蛋白質を段階的に溶出を行うと共に 8ml ずつ溶出液を分画した。各分画に含まれる蛋白質を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて解析し、ヒト VEGF を含む分画 (0.5~1M NaCl 画分) を 120ml 回収した。セントリプレップ-10 (アミコン社製) で濃縮後、ヒト VEGF を溶液として 4ml (蛋白濃度 1.2 mg/ml) 得た。

## 2. 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

1(18)で得られた各種抗原  $10 \sim 50 \mu g$  をそれぞれアルミニウムゲル 2mg および百日咳ワクチン (千葉県血清研究所製)  $1 \times 10^9$  細胞とともに 5 週令雌 BALB/c (日本 S L C 社製)、B6C3F1 マウス (日本チャールズリバー社製) あるいは雌 SD ラット (日本 S L C 社製) に投与し、2 週間後より  $10 \sim 50 \mu g$  の蛋白質を 1 週間に 1 回、計 4 回投与した。また、NIH3T3-KDR 細胞  $1 \times 10^7$  個を 5 週令雌 BALB/c (日本 S L C 社製) 3 匹に投与し、計 6 回投与した。眼底静脈叢、心臓、

あるいは、尾静脈より採血し、その血清抗体価を以下に示す酵素免疫測定法で調べ、3.で示す酵素免疫測定法により十分な抗体価を示したマウスあるいはラットから最終免疫 3 日後に脾臓を摘出した。なお、NIH3T3-KDR 細胞を投与した 5 週令雌 BALB/c では免疫がかからず、可溶性 KDR に対する抗体価は上昇しなかった。

脾臓を MEM 培地（日水製薬社製）中で細断し、ピンセットでほぐし、遠心分離（1,200rpm、5 分間）した後、上清を捨て、トリス-塩化アンモニウム緩衝液（pH7.65）で 1 ～2 分間処理し赤血球を除去し、MEM 培地で 3 回洗浄し、細胞融合に用いた。

### 3. 酵素免疫測定法

1(18)で得られた可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体、KDR 各種誘導体を免疫したマウスあるいはラットに由来する抗血清およびハイブリドーマの培養上清の測定に関しては、抗原として、1(18)の昆虫細胞培養上清より得られた可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体、KDR 各種誘導体を用いた。96 ウェルの EIA 用プレート（グライナー社製）に、PBS 希釈 1 ～10  $\mu$ g/ml 可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体、KDR 各種誘導体および対照抗原として 1 (20) で得られた High Five 細胞培養上清のヘパリンカラム吸着画分、あるいは、抗 GD3 マウスヒトキメラ抗体 KM871 [Cancer Immunology and Immunotherapy, 36, 373(1993)] をそれぞれ 50  $\mu$ l/ウェルで分注し、4  $^{\circ}$ Cで一晩放置して吸着させた。洗浄後、1%牛血清アルブミン(BSA)を含む PBS を 100  $\mu$ l/ウェル加え、室温 1 時間反応させて残っている活性基をブロックした。1%BSA-PBS を捨て、被免疫マウスあるいは被免疫ラット抗血清およびハイブリドーマの培養上清を 50  $\mu$ l/ウェルで分注し 2 時間反応させた。0.05% tween-PBS で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスイムノグロブリンあるいはペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットイムノグロブリン（ともに DAKO 社製）を 50  $\mu$ l/ウェルで加えて室温、1 時間反応させ、0.05% tween-PBS で洗浄後 ABTS

基質液 [2,2-アジノビス (3-エチルベンゾチアゾール-6- スルホン酸) アンモニウム] を用いて発色させ OD415nm の吸光度  $E_{\max}$  [モレキュラー・デバイシーズ (Molecular Devices) 社製] を測定した。

#### 4. マウス骨髓腫細胞の調製

8-アザグアニン耐性マウス骨髓腫細胞株 P3-U1 を正常培地で培養し、細胞融合時に  $2 \times 10^7$  以上の細胞を確保し、細胞融合に親株として供した。

#### 5. ハイブリドーマの作製

2. で得られたマウス脾細胞あるいはラット脾細胞と 4. で得られた骨髓腫細胞とを 10:1 になるよう混合し、遠心分離 (1,200rpm、5 分間) した後、上清を捨て、沈澱した細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、37℃で、ポリエチレングライコール-1000(PEG-1000)2g、MEM 培地 2ml および DMSO 0.7ml の混液 0.2 ~ 1ml/ $10^8$  マウス脾細胞を加え、1 ~ 2 分間毎に MEM 培地 1 ~ 2ml を数回加えた後、MEM 培地を加えて全量が 50ml になるようにした。遠心分離 (900rpm、5 分間) 後、上清を捨て、ゆるやかに細胞をほぐした後、メスピペットによる吸込み、吸出しでゆるやかに細胞を HAT 培地 100ml 中に懸濁した。

#### 6. Binding ELISA によるハイブリドーマスクリーニング

5. で得られた懸濁液を 96 ウェル培養用プレートに 100  $\mu$  l/ウェルずつ分注し、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター中、37℃で 10~14 日間 5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。この培養上清を実施例 1 の 3 に記載した酵素免疫測定法で調べ、1(18)で得られた可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体、KDR 各種誘導体に特異的に反応し、かつ 1 (20) で得られた対照抗原に反応しないウェルを選び、さらに HT 培地と正常培地に換え、2 回クローニングを繰り返して、抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ株を確立した。以下にその結果を示す。

表 1

動物	匹数	免疫原	スクリーニング原	スクリーニング法	スクリーニングしたウエル数	確立したハイブリドーマ数
SDラット	3	KDR(7N')	KDR(7N')	Binding ELISA	3024 4	(KM1660~1663)
SDラット	2	KDR(7N')	KDR(7N)		2016 1	(KM1667)
Balb/cマウス	1	KDR(2N)-Fc	KDR(7N)		420 7	(KM1859~1865)
Balb/cマウス	1	KDR/NIH3T3 cell	KDR(7N')		504 1	(KM1659)
Balb/cマウス	1	KDR(7N')	KDR(7N')		420 1	(KM1664)
Balb/cマウス	1	KDR(7N')	KDR(7N)-Fc		420 2	(KM1665,1666)
Balb/cマウス	2	KDR(7N')	KDR(2N)-Fc		840 1	(KM1668)
Balb/cマウス	2	KDR(2N)-Fc	KDR(7N)		840 1	(KM1768)
Balb/cマウス	2	KDR(7N)	KDR(3N)-Fc		840 2	(KM1825,1826)
Balb/cマウス	2	KDR(7N)	KDR(5N)-Fc		840 4	(KM1827~1830)
Balb/cマウス	2	KDR(7N)	KDR(5N)		840 14	(KM1831~1838, 1853~1858)
Balb/cマウス	4	KDR(5N)	KDR(5N)		1680 10	(KM1943~1950, 1932, 1933)
Balb/cマウス	1	KDR(7N)	KDR(7N')		420 3	(KM1778~1780)
Balb/cマウス	1	KDR(7N)-Fc	KDR(5N)		504 3	(KM1987~1989)
Balb/cマウス	1	KDR(5N)-Fc	KDR(5N)		420 1	(KM1942)
Balb/cマウス	3	KDR(5N)	KDR(5N)		1260 8	(KM1943~1950)
Balb/cマウス	3	KDR(7N)-Fc	KDR(5 $\Delta$ 1N)-Fc		1260 11	(KM1965~1975)
B6C3F1マウス	1	KDR(7N)-Fc	KDR(5 $\Delta$ 1N)-Fc/RI	VEGF-KDR結合阻害試験	420 0	
B6C3F1マウス	1	KDR(5 $\Delta$ 1N)-Fc	KDR(7N)-Fc/RI		420 7	(KM1991~1997)



1(18)で得られた可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体、KDR 各種誘導体および KDR-NIH3T3 細胞を免疫した Balb/c マウス、B6C3F1 マウス、あるいは SD ラット計 32 匹から得られたハイブリドーマを約 16548 ウエルスクリーニングし、1(18)で得られた可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体、KDR 各種誘導体に特異的に反応し、かつ 1 (20) で得られた対照抗原あるいは KM871 に反応しない計 74 クローンの抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体を取得し、それぞれ表 1 のように命名した。これらの抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体の中で、40 個のモノクローナル抗体 (KM1668、1768、1825、1826、1827、1828、1829、1831、1835、1837、1853、1856、1857、1859、1860、1861、1862、1863、1864、1865、1933、1942、1943、1944、1945、1946、1947、1948、1949、1950、1987、1988、1989、1858、1832、1833、1834、1836、1838、1932) が 15. で示す免疫細胞染色法により細胞表面上の KDR に反応することが示された。しかし、血管内皮細胞の VEGF 刺激による増殖促進活性を阻害する活性を示すような KDR の生物活性を阻害するモノクローナル抗体は取得できなかった。

## 7. モノクローナル抗体のエピトープ解析

6. で述べた抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体の特異性をハイブリドーマ培養上清を用いて 3. に記載した酵素免疫測定法を用いて確認した。

代表的な結果を第 6 図に、まとめた結果を第 7 図に示す。上記 74 種のモノクローナル抗体のうち、KM1668 他 32 種が 1 番目の Ig 様ドメイン (1~104 アミノ酸に対応) に反応し、KM1987 他 3 種が 1 番目の Ig 様ドメイン (1~104 アミノ酸に対応) と 2 番目の Ig 様ドメイン (105~194 アミノ酸に対応) の間に反応し、KM1855 他 5 種が 2 番目の Ig 様ドメイン (105~194 アミノ酸に対応) に反応し、KM1858 他 2 種が 3 番目の Ig 様ドメイン (195~294 アミノ酸に対応) に反応し、KM1854 他 3 種が 4 番目の Ig 様ドメイン (295~393 アミノ酸に対応) に反応し、KM1832 他 14 種が 5 番目の Ig 様ドメイン (394~518 アミノ酸に対応) に反応し、

KM1665 他 2 種が 6~7 番目の g 様ドメイン (519~738 アミノ酸に対応) に反応した。従って、1 番目の Ig 様ドメインに対する免疫原性の高いモノクローナル抗体の 43% が 1 番目の Ig 様ドメインに反応した。(21) で示したように KDR の 1 番目の Ig 様ドメインは VEGF の結合活性に関与しないが、免疫原性が高いため、ELISA スクリーニングでは中和活性を示すモノクローナル抗体の作製が困難であると推定された。

#### 8. [<sup>125</sup>I] VEGF-KDR 結合阻害アッセイによる抗体価の測定

免疫原性が高く、中和活性に関係のない 1 番目の Ig 様ドメインに対するモノクローナル抗体を排除するため、1 (18) で得られた KDR-5Δ1N-Fc をマウスに免疫した。マウス抗血清のヒト VEGF とヒト VEGF 受容体 KDR の結合阻害活性を以下の手順に従い評価した。

96 ウェル・マルチスクリーン-IP プレート (96-well MultiScreen-IP Plate ; ミリポア社製) にメタノールを 100  $\mu$  l/ウェルで分注し、プレート底部の PVDF 膜を親水化した。水で洗浄後、PBS で 4  $\mu$  g/ml の濃度に希釈した可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7N-Fc を 50  $\mu$  l/ウェルで分注し、4  $^{\circ}$ C で一晩放置して吸着させた。洗浄後、1 % 牛血清アルブミン(BSA) 含有 PBS を 200  $\mu$  l/ ウェル加え、室温 30 分間反応させて残っている活性基をブロックした。PBS で洗浄後、1%BSA-PBS 溶液で 100、1000、10000 倍に希釈した抗血清、1%BSA-PBS 溶液で希釈した精製モノクローナル抗体 (0.01~25  $\mu$  g/ml) 、あるいは、ハイブリドーマの培養上清を 50  $\mu$  l/ウェルで分注し、さらに、4 ng/ml の <sup>125</sup>I 標識ヒト VEGF (アマシャム社製) を 50  $\mu$  l/ウェル加え室温で 1.5 時間反応させた。

0.05% tween-PBS で洗浄後、50 $^{\circ}$ C にてウェルを乾燥させ、マイクロシンチ-0 (パッカー社製) を 10  $\mu$  l/ウェル加え、トップカウント (パッカー社製) を用いて、各ウェルに結合した <sup>125</sup>I 標識ヒト VEGF の放射活性を測定した。

ハイブリドーマの培養上清の活性を検討した結果を表 2 に示した。

表 2

	Serum Dilution	% Inhibition		
		1/10000	1/1000	1/100
Immunogen	Mouse #			
Control		0	2.6	0
KDR7N-Fc	#B	0.35	0	47.7
	#C	16.1	6.7	55.6
	#D	7.8	10.5	55.7
KDR5N	#A	9.7	3.4	16.5
	#C	14.1	0	1.1
	#3	1	0	19.2
KDR5N-Fc	#B	5.7	14.7	51.4
	#A	7.2	6	53.7
KDR5 $\Delta$ 1N-Fc	#1	11.7	16.2	55.6
	#2	11.6	15.8	46.9
	#3	7.9	34.3	70.3
KDR2N-Fc	#1	0	2.6	27.6
	#2	1.4	0.5	36.2

KDR-5 $\Delta$ 1N-Fc 免疫したマウス 3 匹の抗血清は全て 100 倍希釈において 50% 以上の結合阻害活性を示し、3 匹中 1 匹の抗血清は 1000 倍希釈において 34.3% と最も強い結合阻害活性を示した。KDR-7N-Fc, KDR-5N-Fc 免疫マウスそれぞれ 3 匹、2 匹の抗血清は 100 倍希釈において 50% 以上の結合阻害活性を示した。

従って、結合阻害活性が最も強く、さらに、免疫原性の強い 1 番目の Ig 様ドメインを含まない KDR-5△1N-Fc が免疫原として適することが示された。

9. [<sup>125</sup>I] VEGF-KDR 結合阻害アッセイによるハイブリドーマのスクリーニング

KDR-5N-Fc 免疫マウス 1 匹よりハイブリドーマを作製し、得られた約 672 ウェルの培養上清を用いて 8.で示した[<sup>125</sup>I]VEGF-KDR 結合阻害アッセイでスクリーニングしたところ、培養上清では 90.1、66.7、59.0、85.7、86.8、78.0、91.2% の結合阻害活性を示す 7 クローンのモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを得、これらをそれぞれ KM1991～1997 と命名した（表 1）。

10. モノクローナル抗体 KM1991～1997 のエピトープ解析

9.で述べた抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体の特異性を精製抗体 5 μg/ml を用いて 3 に記載した酵素免疫測定法を用いて確認した。

代表的な結果を第 8 図に、まとめた結果を第 7 図に示す。KM1992、KM1995 に代表される上記 7 種のモノクローナル抗体は全て 4 番目の Ig 様ドメイン（295～393 アミノ酸に対応）に反応した。従って、KDR の N 末から 4 番目の Ig 様ドメイン（295～393 アミノ酸に対応）が VEGF との結合に特に重要であることが示された。特に、KM1991、KM1992、KM1993、KM1994 および KM1995 は、13. に示した VEGF 受容体 KDR の自己リン酸化阻害活性、あるいは、14.に示した VEGF 依存的血管内皮細胞の増殖阻害活性を示し、KDR の生物活性を阻害する中和モノクローナル抗体であることが示された。6.で取得された計 74 クローンの抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体では、KDR の生物活性を阻害する中和モノクローナル抗体を取得することができなかったのに対し、9.では中和モノクローナル抗体が取得できたことから、免疫原性の強い 1 番目の Ig 様ドメインを含まない KDR-5△1N-Fc が免疫原として適すること、[<sup>125</sup>I]VEGF-KDR 結合阻害アッセイがハイブリドーマスクリーニング系として適することが明らかとなった。

モノクローナル抗体の抗体クラスを決めるためにサブクラスタイピングキッ

ト〔ザイメット (Zymed) 社製〕を用いた酵素免疫測定法を行った。その結果を以下の表 3 に示す。

表 3

抗体クラス	KM番号
IgG1	1665, 1666, 1668, 1768, 1778-1780, 1825-1829, 1831, 1838, 1853-1858, 1862, 1863, 1865, 1943-1950, 1965, 1967, 1968, 1971-1975, 1987-1989, 1992, 1994
IgG2a	1830, 1859-1861, 1864, 1966, 1969, 1970
IgG2b	1993, 1995
IgG3	
IgM	1659, 1942
IgA	1664
IgE	1991, 1996, 1997

本発明で確立したモノクローナル抗体は IgM である KM1659、KM1942、IgA である KM1664、IgE である KM1991、KM1996、KM1997 を除き、すべて IgG クラスであった。

#### 11. モノクローナル抗体の精製

プリスタン処理した 8 週令ヌード雌マウス (Balb/c) に 6、9 で得られたハイブリドーマ株を  $5 \sim 10 \times 10^6$  細胞/匹それぞれ腹腔内に注射した。10～21 日後に、ハイブリドーマは腹水癌化した。腹水のたまったマウスから、腹水を採取 (1～

8ml/匹) し、遠心分離 (3,000rpm、20 分間) して固形分を除去した後カプリル酸沈殿法 (アンチボディース・ア・ラボラトリー・マニュアル) により精製し、精製モノクローナル抗体とした。

## 12. 抗 KDR モノクローナル抗体によるヒト VEGF とヒト VEGF 受容体 KDR の結合阻害活性の確認

9. で述べた抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体のヒト VEGF とヒト VEGF 受容体 KDR の結合阻害活性を 8. に示した手順に従い確認した。

対照として、抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体のヒト VEGF とヒト VEGF 受容体 Flt-1 の結合阻害活性を以下の手順に従い確認した。

96 ウェル・マルチスクリーン-IP プレート (96-well MultiScreen-IP Plate ; ミリポア社製) にメタノールを 100  $\mu$  l/ウェルで分注し、プレート底部の PVDF 膜を親水化した。水で洗浄後、PBS で 1.6  $\mu$  g/ml の濃度に希釈した可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N を 50  $\mu$  l/ウェルで分注し、4  $^{\circ}$ C で一晩放置して吸着させた。洗浄後、1 %牛血清アルブミン(BSA) 含有 PBS を 50  $\mu$  l/ ウェル加え、室温 1 時間反応させて残っている活性基をブロックした。PBS で洗浄後、ハイブリドーマの培養上清あるいは 0.5M NaCl を含む 1%BSA-PBS 溶液で希釈した精製モノクローナル抗体 (0.01~7.29  $\mu$  g/ml) を 50  $\mu$  l/ウェルで分注し、さらに、3ng/ml の  $^{125}$ I 標識ヒト VEGF (アマシャム社製) を 50  $\mu$  l/ ウェル加え室温で 1.5 時間反応させた。0.05%Tween-PBS で洗浄後、50 $^{\circ}$ C にてウェルを乾燥させ、マイクロシンチ-O (パッカード社製) を 30  $\mu$  l/ウェル加え、トップカウント (パッカード社製) を用いて、各ウェルに結合した  $^{125}$ I 標識ヒト VEGF の放射活性を測定した。

結果を第 8 図に示す。KM1992、1993、1994、1995 は濃度依存的にヒト VEGF とヒト VEGF 受容体 KDR の結合を阻害した。ヒト VEGF とヒト VEGF 受容体 KDR の結合の 50%阻害を示す KM1992、1993、1994、1995 の濃度 ( $IC_{50}$ ) は 2.26、2.43、0.74、1.95  $\mu$  g/ml であった。一方、コントロールとして使用したマウス

IgG1 クラスである抗シアリルルイス A モノクローナル抗体 KM231 [アンチキャンサー・リサーチ(Anticancer Research), 10, 1579(1990) ] は全く阻害活性を示さなかった。さらに、コントロール実験系として用いたヒト VEGF とヒト VEGF 受容体 Flt-1 の結合を KM1992、1993、1994、1995 は全く阻害せず、KM1992、1993、1994、1995 は KDR 特異的な結合阻害剤であることが示された。

### 13. 抗 KDR モノクローナル抗体による VEGF 受容体 KDR の自己リン酸化阻害

9 .で述べた抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体によるヒト VEGF の生物活性の阻害を以下の手順により確認した。

ヒト VEGF 受容体 KDR 発現 NIH3T3 細胞(NIH3T3-KDR)を 10%FCS-DMEM 培地 20ml を用いて 175cm<sup>2</sup> フラスコにて 5~10×10<sup>6</sup>cells/フラスコになるまで培養した。培養後、0.1 mM のオルトバナジン酸 (V) ナトリウムを含む 0.1%FCS-DMEM10ml に交換し、抗 VEGF 受容体 KDR 抗体を 10 μg/ml となるように添加して氷上で 30 分間前処理を行った。前処理後、ヒト VEGF (R&D 社製)を 50 ng/ml となるように添加し、氷上で 45 分間刺激を行った。刺激後、フラスコから培地を除去し、細胞破碎緩衝液 [20 mM Hepes (pH7.4), 150 mM NaCl, 0.2% Triton X-100, 10% Glycerol, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM PMSF, 10 μg/ml aprotinin, 5 μg/ml leupeptin] を 2ml 加え、細胞を破碎し、細胞破碎液を得た。細胞破碎液を 15,000×g で 10 分間遠心分離を行い、上清にヤギ抗マウス IgG(H+L)セファロース 4B (Zymed Laboratories 社製)を 100 μl 添加し 4℃で 1 時間穏やかに混合した。5,000 ×g で 1 分間遠心分離後、上清にヤギ抗マウス IgG(H+L)セファロース 4B を 30 μl、マウス抗 KDR モノクローナル抗体 KM1668 を 10 μg 添加し、4℃で 1 晩穏やかに混合し、免疫沈降を行った。5,000 ×g で 1 分間遠心分離を行い、セファロースを回収し、回収したセファロースを 1ml の細胞破碎緩衝液で洗浄した。洗浄操作は繰り返して 6 回行った。洗浄後、回収したセファロースから 30 μl の 2-メルカプトエタノールを含む SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動用サンプルバッファー (2 倍濃度) にて吸着タンパク

質を溶出し、全量を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動、ウエスタンブロットティングに供した。ブロットティング後の PVDF 膜は 1%BSA-PBS に室温で 30 分間反応させブロッキング操作を行い、ウサギ抗リン酸化チロシン抗体 ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) (Upstate Biotechnology Incorporated 社製) を  $4^{\circ}\text{C}$  にて 1 晩反応させた。0.05% Tween-PBS で洗浄し、ペルオキシダーゼ標識したブタ抗ウサギ IgG (1000 倍希釈: Dako 社製) を室温で 1 時間反応させた。0.05% Tween-PBS で洗浄し、ECL<sup>TM</sup> Western blotting detection reagents (アマシャム社製) を用いて、ウサギ抗リン酸化チロシン抗体が結合したバンドを検出した。

結果を第 10 図に示す。VEGF 添加により VEGF 受容体 KDR の自己リン酸化が検出されたが、マウス抗 KDR モノクローナル抗体 KM1991, 1992, 1994, 1995 添加により KDR の自己リン酸化が抑制された。

#### 14. 抗 KDR モノクローナル抗体による VEGF 依存的血管内皮細胞の増殖阻害

9. で述べた抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体によるヒト VEGF の生物活性の阻害を以下の手順により確認した。

48 ウエルマイクロタイタープレートに E-BM 培地に 5 %ウシ胎児血清 (FBS)、ヒト組み換え型上皮成長因子 (hEGF)  $10\text{ng/ml}$ 、ハイドロコチゾン  $1 \mu\text{g/ml}$ 、ゲンタマイシン  $50 \mu\text{g/ml}$ 、アンファテリシン B  $50\text{ng/ml}$  を添加した培地 (クラボウ社製) に浮遊させたヒト皮膚由来微小血管内皮細胞 HMVEC (クラボウ社製) を 4000 個/ $800 \mu\text{l}$ /ウエルになるように加えた。次に、上記培地で希釈した精製抗 VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体 (終濃度  $2 \mu\text{g/ml}$  および  $20 \mu\text{g/ml}$ )  $100 \mu\text{l}$ /ウエルで添加し、さらに、上記培地で希釈したヒト VEGF (R&D 社製) を  $100 \mu\text{l}$ /ウエル (終濃度  $1\text{ng/ml}$ ) で添加し、 $37^{\circ}\text{C}$   $\text{CO}_2$  インキュベーター中で 5 日間培養した。培養後、培養上清を除去し、 $200 \mu\text{l}$  の 10%FCS 添加のフェノールレッド除去 RPMI1640 (ニッスイ社製) を各ウエルに加え、さらに、 $20 \mu\text{l}$  の細胞発色用試薬 (Cell Counting Kit; 同仁化学社製) を加え、 $37^{\circ}\text{C}$  で 1 ~2 時間培養した。培養終了後、 $150 \mu\text{l}$  を EIA 用 96 ウエルマイクロタイタープレート



に移し、OD450nm の吸光度を測定した。1 ng/ml の VEGF 添加時の HMVEC の増殖を 100%、VEGF 非添加時の HMVEC の増殖を 0% とした相対的な細胞増殖活性を示した。

結果を第 11 図に示す。抗 VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体 KM1992 および KM1995 は濃度依存的に VEGF 依存的な HMVEC の増殖を阻害した。2  $\mu$  g/ml 添加時の KM1992 および KM1995 の増殖阻害活性は、それぞれ 74.3%、70.9%、20  $\mu$  g/ml 添加時の KM1992 および KM1995 の増殖阻害活性は、それぞれ 108.7%、103.0 % であった。一方、コントロールとして使用した KM231 および抗体非添加群は阻害活性を示さなかった。

#### 15. モノクローナル抗体のヒト VEGF 受容体 KDR 発現細胞との反応性の確認

6 および 9 で述べた抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体の特異性を免疫細胞染色を用いて以下の手順に従い確認した。

ヒト VEGF 受容体 KDR 発現 NIH3T3 細胞(NIH3T3-KDR)、コントロール NIH3T3 細胞(NIH3T3-Neo)、ヒト皮膚由来微小血管内皮細胞 HMVEC (クラボウ社製)、ヒトさい帯静脈由来血管内皮細胞 HUVEC (クラボウ社製) 2~5  $\times 10^5$  個を丸底 96 ウェルプレートに免疫細胞染色用緩衝液 (1% BSA 、 0.02% EDTA 、 0.05% アジ化ナトリウムを含む PBS ) 100  $\mu$  l に懸濁して分注した。4  $^{\circ}$ C、350 $\times$ g で 1 分間遠心分離後、上清を除き、6、9 で述べた精製抗体 (10  $\mu$  g/ml) 50  $\mu$  l を加えて 4  $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。反応後、200  $\mu$  l の免疫細胞染色用緩衝液を各ウェルに加え 4  $^{\circ}$ C、350 $\times$ g で 1 分間遠心分離後、上清を除き細胞の洗浄を行った。この洗浄操作をさらに 2 回行った後、FITC 標識抗マウスイムノグロブリン抗体あるいは FITC 標識抗ラットイムノグロブリン抗体 (和光純薬社製) を 1  $\mu$  g/ml の濃度で含む免疫細胞染色用緩衝液 50  $\mu$  l を加えて 4  $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。反応後、上記と同様の洗浄操作を 3 回行った後フローサイトメーター (コールター社製) を用いて解析を行った。

結果を第 12 図に示す。抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体 KM1668

はコントロール細胞には反応せず KDR 発現細胞に特異的に顕著に反応した(A)。  
また、ヒト血管内皮細胞 HMVEC および HUVEC に反応し、血管内皮細胞上の KDR を検出可能性あることが示された。

また、9.で示した<sup>[125]</sup>I-VEGF-KDR 結合阻害アッセイにより選択された KM1992、KM1993、KM1994、KM1995 は、ヒト血管内皮細胞 HMVEC および HUVEC に反応し、血管内皮細胞上の KDR を検出可能性あることが示された（第 13 図）。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、ヒト血管新生部の血管内皮細胞上に特異的に発現されているヒト VEGF 受容体 KDR に特異的に結合するモノクローナル抗体が提供される。本発明のモノクローナル抗体は免疫細胞染色におけるヒト血管新生部の免疫学的検出、KDR の作用の中和による固形腫瘍の増殖、転移形成、慢性関節リュウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、乾癬など異常な血管新生により病態が進行する疾患の診断あるいは治療に有用である。

#### 配列表フリーテキスト

配列番号 1－人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 2－人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 3－人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 4－人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 5－人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 6－人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 7－人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 8－人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 9－人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 10－人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 11－人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 1 2 – 人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 1 3 – 人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 1 4 – 人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 1 5 – 人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 1 6 – 人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 1 7 – 人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 1 8 – 人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 1 9 – 人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 2 0 – 人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 2 1 – 人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 2 2 – 人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 2 3 – 人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 2 4 – 人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 2 5 – 人工配列の説明：合成 DNA

## 請求の範囲

1. ヒト VEGF 受容体 KDR に反応するが、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 には反応しないモノクローナル抗体。
2. モノクローナル抗体が、ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域に特異的に結合するモノクローナル抗体である、請求項 1 記載のモノクローナル抗体。
3. モノクローナル抗体が、ヒト VEGF のヒト VEGF 受容体 KDR への結合を阻害し、かつ KDR の作用を中和するモノクローナル抗体である、請求項 1 記載のモノクローナル抗体。
4. モノクローナル抗体が、ヒト VEGF 受容体 KDR の、配列番号 26 に記載されたアミノ酸配列 1～518 番目の領域にあるエピトープを認識するモノクローナル抗体である、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体。
5. モノクローナル抗体が、ヒト VEGF 受容体 KDR の、配列番号 26 に記載されたアミノ酸配列 1～104、1～194、105～393、295～393 および 394～518 番目から選ばれるアミノ酸配列の領域にあるエピトープを認識するモノクローナル抗体である、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体。
6. モノクローナル抗体が、マウス IgG1 サブクラスまたはマウス IgG2b サブクラスに属する、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体。
7. モノクローナル抗体が、モノクローナル抗体 KM1668、KM1992 および KM1995 から選ばれる、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体。
8. 請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ。
9. ハイブリドーマが KM1668(FERM BP-6216)、KM1992(FERM BP-6217)または KM1995(FERM BP-6218)である、請求項 8 記載のハイブリドーマ。
10. モノクローナル抗体が、遺伝子組換え抗体である、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体。

11. 遺伝子組換え抗体が、ヒト化抗体、一本鎖抗体およびジスルフィド安定化抗体から選ばれるモノクローナル抗体である、請求項 10 記載のモノクローナル抗体。

12. ヒト化抗体がヒト型キメラ抗体である請求項 11 記載の抗体。

13. ヒト型キメラ抗体が、請求項 1～6 のいずれかに記載のモノクローナル抗体の抗体重鎖（H 鎖）可変領域（V 領域）および抗体軽鎖（L 鎖）V 領域と、ヒト抗体の H 鎖定常領域（C 領域）および L 鎖 C 領域とからなるキメラ抗体である請求項 12 記載のヒト型キメラ抗体。

14. H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のアミノ酸配列が、モノクローナル抗体 KM1668(FERM BP-6216)、モノクローナル抗体 KM1992(FERM BP-6217)またはモノクローナル抗体 KM1995(FERM BP-6218)から選ばれるモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、請求項 13 記載のヒト型キメラ抗体。

15. ヒト化抗体が CDR（相補性決定領域）移植抗体である請求項 11 記載の抗体。

16. CDR 移植抗体が請求項 1～6 のいずれかに記載のモノクローナル抗体の H 鎖および L 鎖の V 領域相補性決定領域と、ヒト抗体の H 鎖および L 鎖の C 領域および V 領域フレームワーク領域とからなる抗体である請求項 15 記載の CDR 移植抗体。

17. H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の相補性決定領域のアミノ酸配列が、モノクローナル抗体 KM1668(FERM BP-6216)、モノクローナル抗体 KM1992(FERM BP-6217)またはモノクローナル抗体 KM1995(FERM BP-6218)から選ばれるモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の相補性決定領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、請求項 16 記載の CDR 移植抗体。

18. 一本鎖抗体が、抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域を含む、請求項 11 記載の一本鎖抗体。

19. 一本鎖抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列が、請求項1～6から選ばれるモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、請求項18記載の一本鎖抗体。

20. 一本鎖抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域の相補性決定領域のアミノ酸配列が、請求項1～6から選ばれるモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域の相補性決定領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、請求項18記載の一本鎖抗体。

21. 一本鎖抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列が、モノクローナル抗体 KM1668(FERM BP-6216)、モノクローナル抗体 KM1992(FERM BP-6217)またはモノクローナル抗体 KM1995(FERM BP-6218)から選ばれるモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、請求項19記載の一本鎖抗体。

22. 一本鎖抗体のH鎖およびL鎖のV領域の相補性決定領域のアミノ酸配列が、モノクローナル抗体 KM1668(FERM BP-6216)、モノクローナル抗体 KM1992(FERM BP-6217)またはモノクローナル抗体 KM1995(FERM BP-6218)から選ばれるモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域の相補性決定領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、請求項20記載の一本鎖抗体。

23. ジスルフィド安定化抗体が、抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域を含む、請求項11記載のジスルフィド安定化抗体。

24. ジスルフィド安定化抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列が、請求項1～6から選ばれるモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、請求項23記載のジスルフィド安定化抗体。

25. ジスルフィド安定化抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域の相補性決定領域のアミノ酸配列が、請求項1～6から選ばれるモノクローナル抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域の相補性決定領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を

有する、請求項 23 記載のジスルフィド安定化抗体。

26. ジスルフィド安定化抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のアミノ酸配列が、モノクローナル抗体 KM1668(FERM BP-6216)、モノクローナル抗体 KM1992(FERM BP-6217)またはモノクローナル抗体 KM1995(FERM BP-6218)から選ばれるモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、請求項 24 記載のジスルフィド安定化抗体。

27. ジスルフィド安定化抗体の H 鎖および L 鎖の V 領域の相補性決定領域のアミノ酸配列が、モノクローナル抗体 KM1668(FERM BP-6216)、モノクローナル抗体 KM1992(FERM BP-6217)またはモノクローナル抗体 KM1995(FERM BP-6218)から選ばれるモノクローナル抗体の H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域の相補性決定領域のアミノ酸配列と同じアミノ酸配列を有する、請求項 25 記載のジスルフィド安定化抗体。

28. 請求項 1～7、10～27 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を用いてヒト VEGF 受容体 KDR を免疫学的に検出する方法。

29. 請求項 1～7、10～27 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を用いてヒト VEGF 受容体 KDR を免疫学的に定量する方法。

30. 請求項 1～7、10～27 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を用いてヒト VEGF 受容体 KDR を細胞表面に発現した細胞を免疫学的に検出する方法。

31. 請求項 1～7、10～27 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を用いてヒト VEGF 受容体 KDR を細胞表面に発現した細胞を免疫学的に定量する方法。

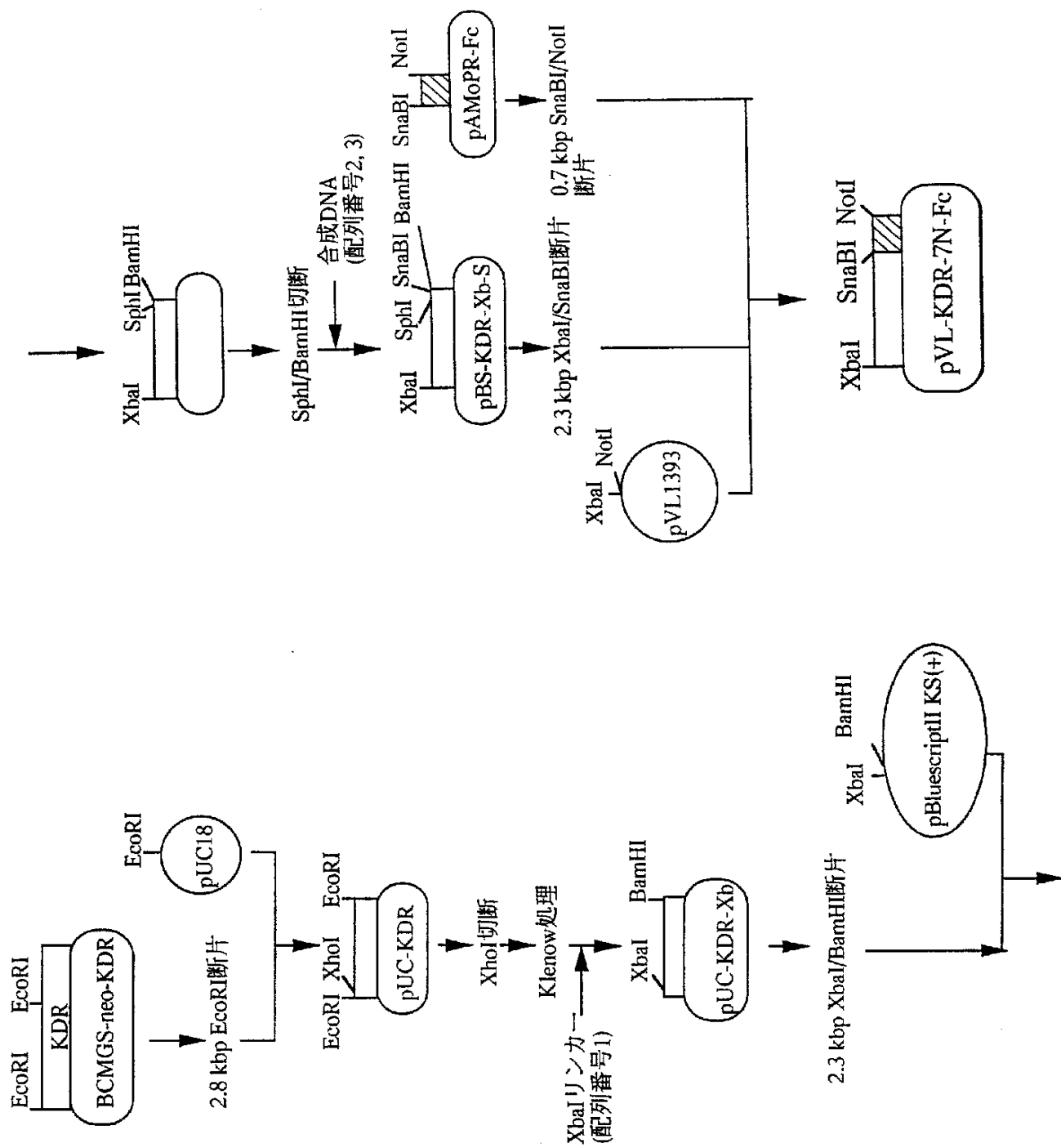
32. 請求項 1～7、10～27 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を用いてヒト VEGF とヒト VEGF 受容体 KDR との結合を阻害する方法。

33. 請求項 1～7、10～27 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を用いてヒト VEGF 受容体 KDR を中和する方法。

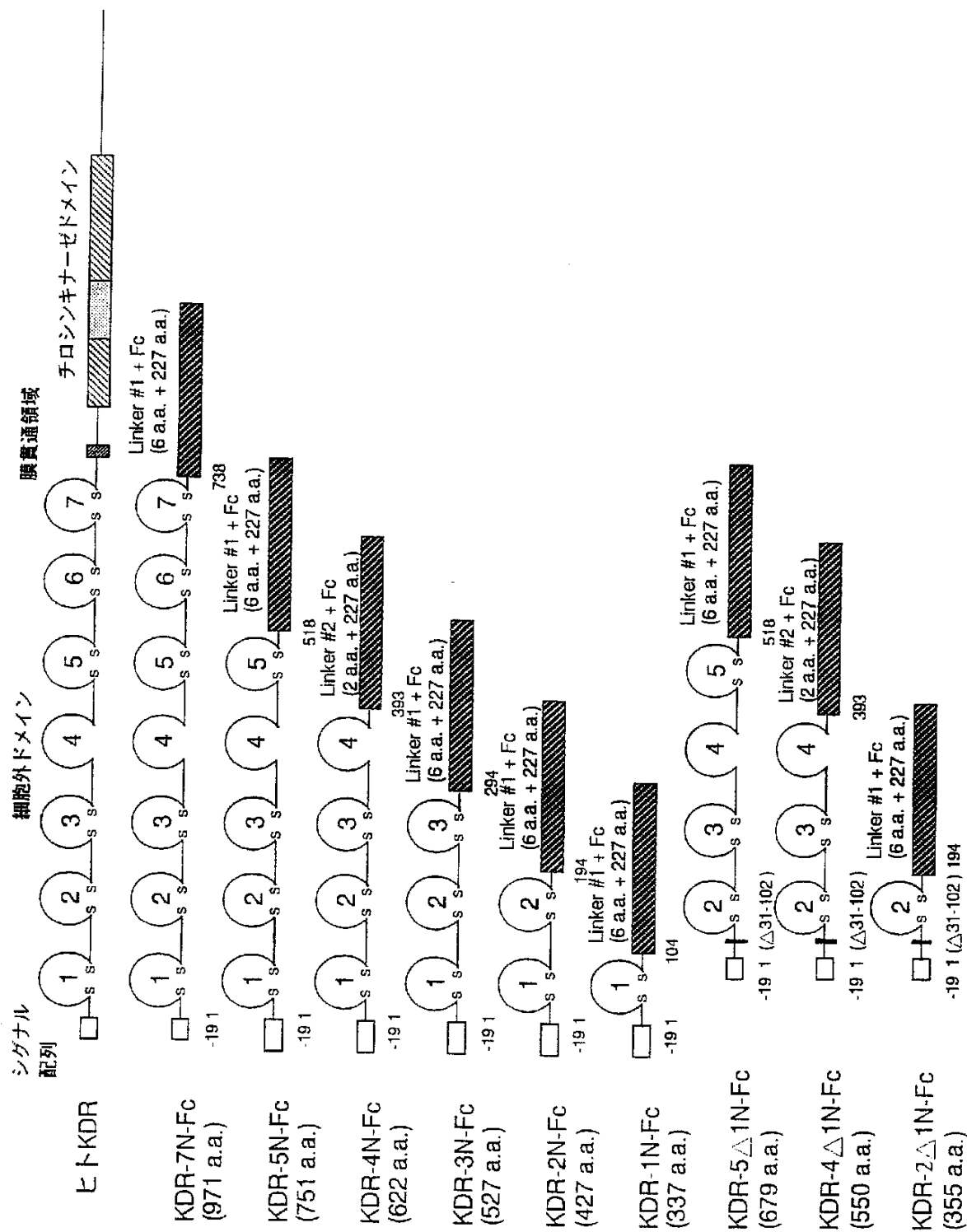
34. 請求項 1 ～7、10～27 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を用いる、血管新生異常疾患の診断方法。
35. 請求項 1 ～7、10～27 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を用いる、血管新生異常疾患の治療方法。
36. 請求項 1 ～7、10～27 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を有効成分とする、血管新生異常疾患の診断薬。
37. 請求項 1 ～7、10～27 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を有効成分とする、血管新生異常疾患の治療薬。



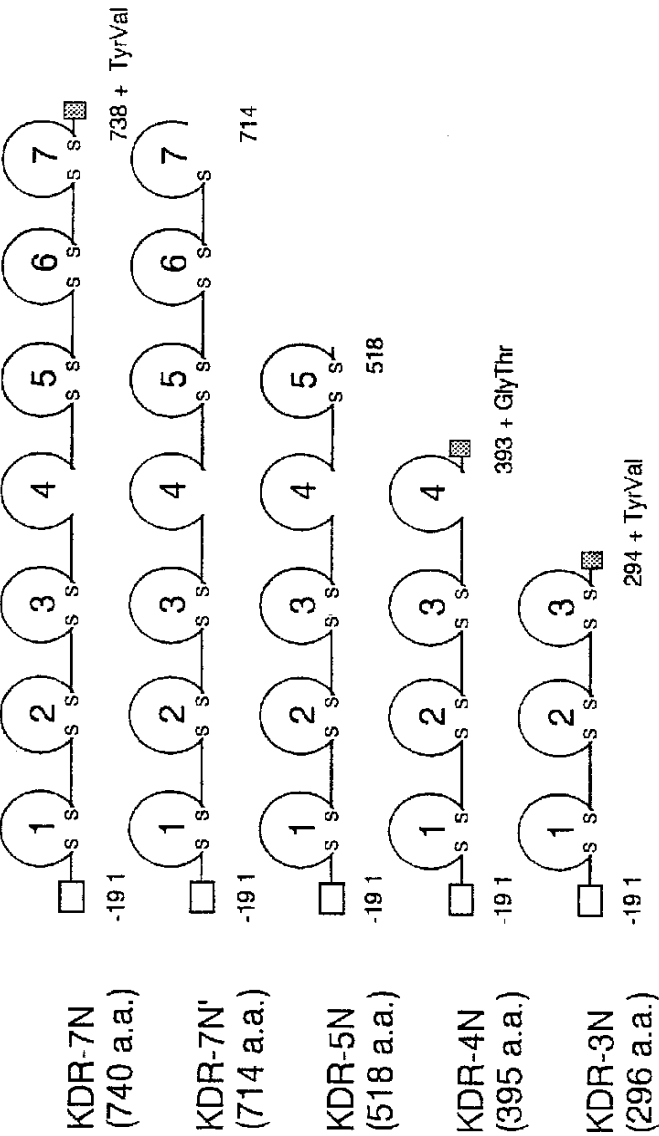
## 第 1 図



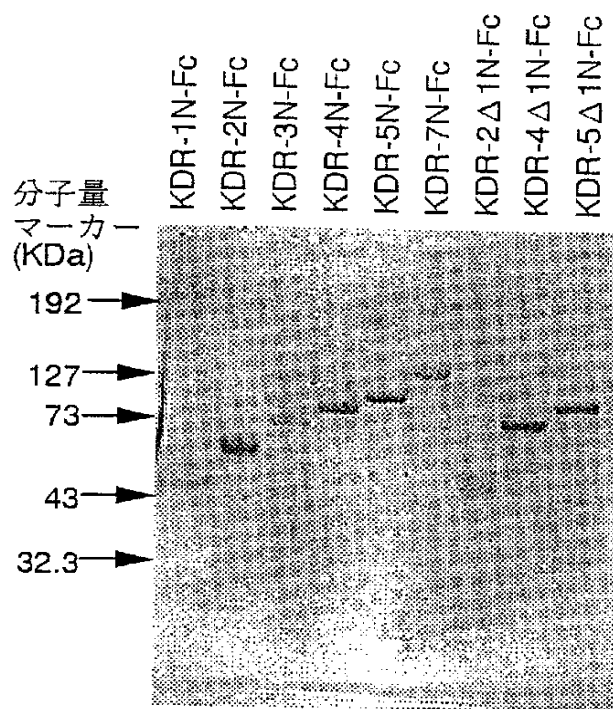
## 第 2 図



第 3 図



## 第 4 図



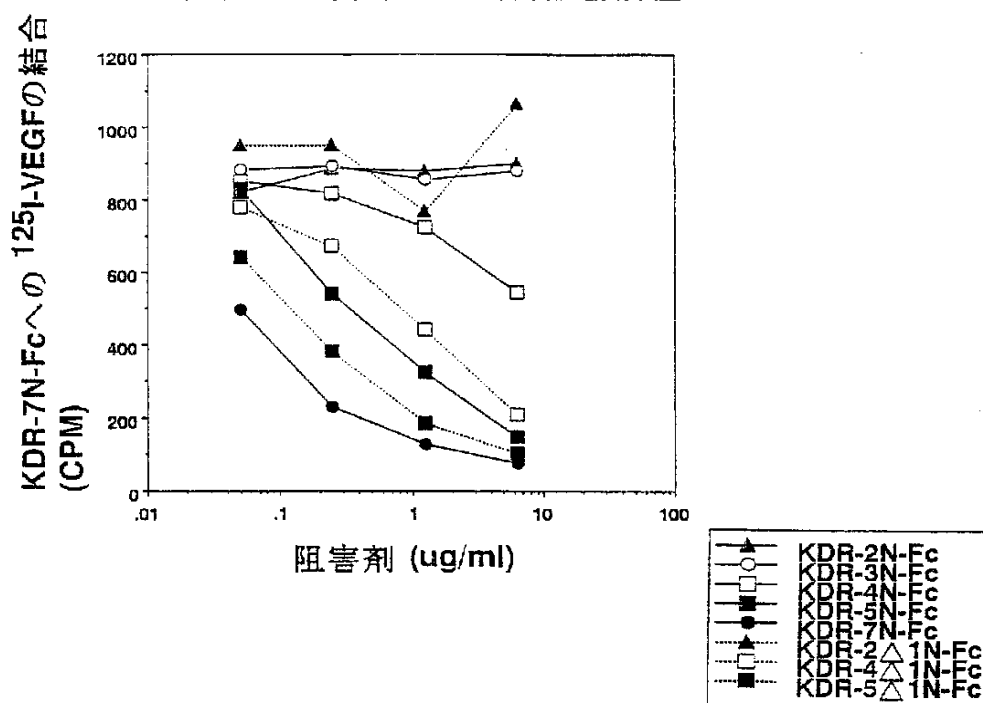
還元条件

2ug タンパク/レーン

## 第 5 図

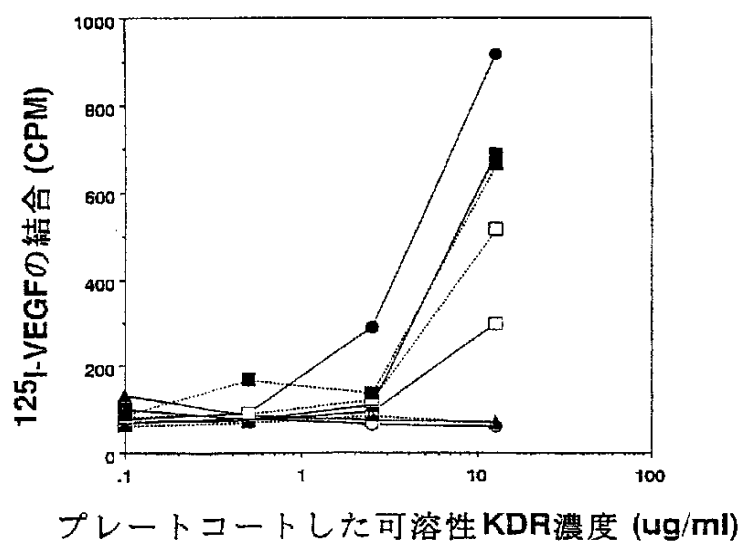
A

可溶性KDR誘導体の競合阻害活性

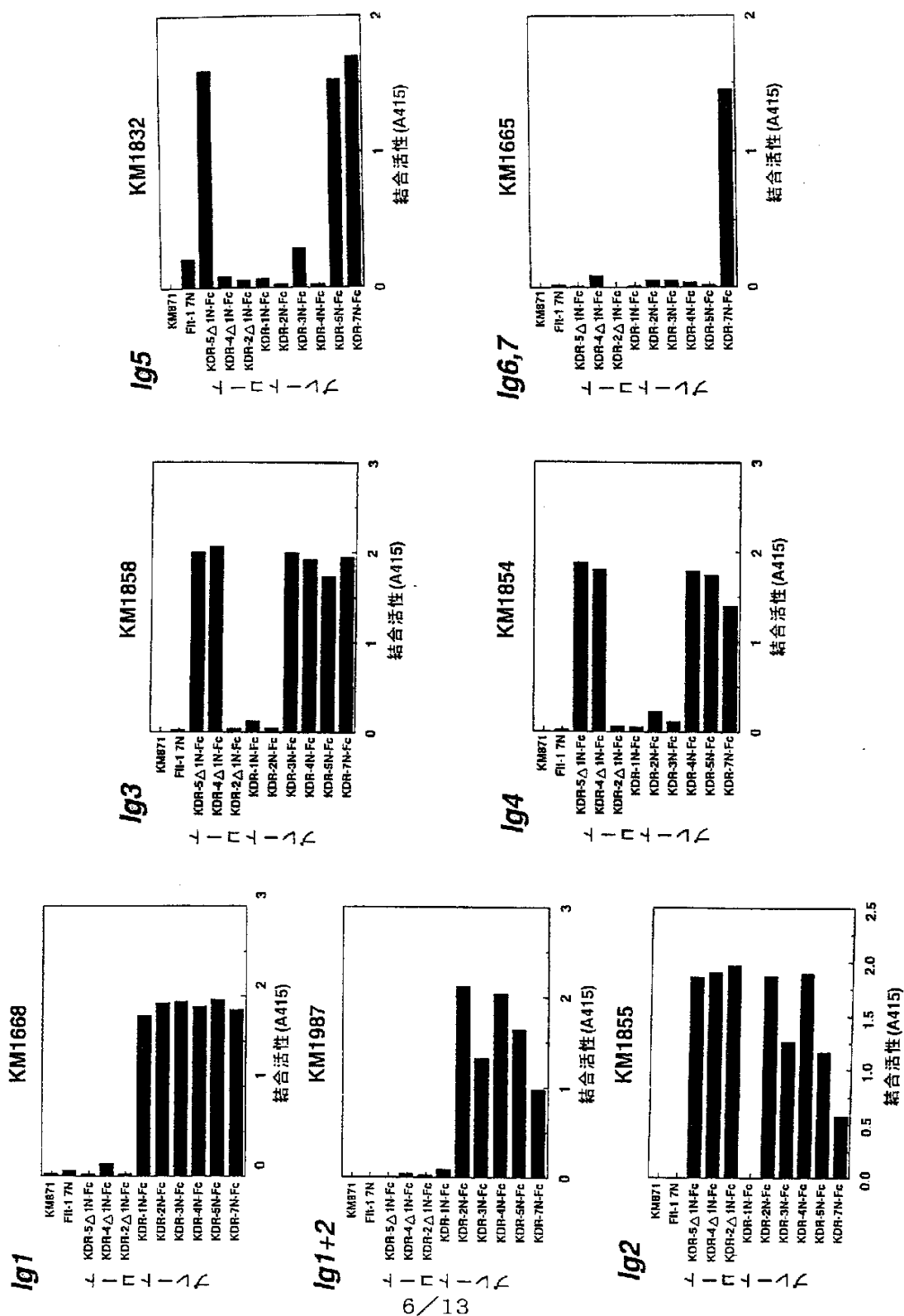


B

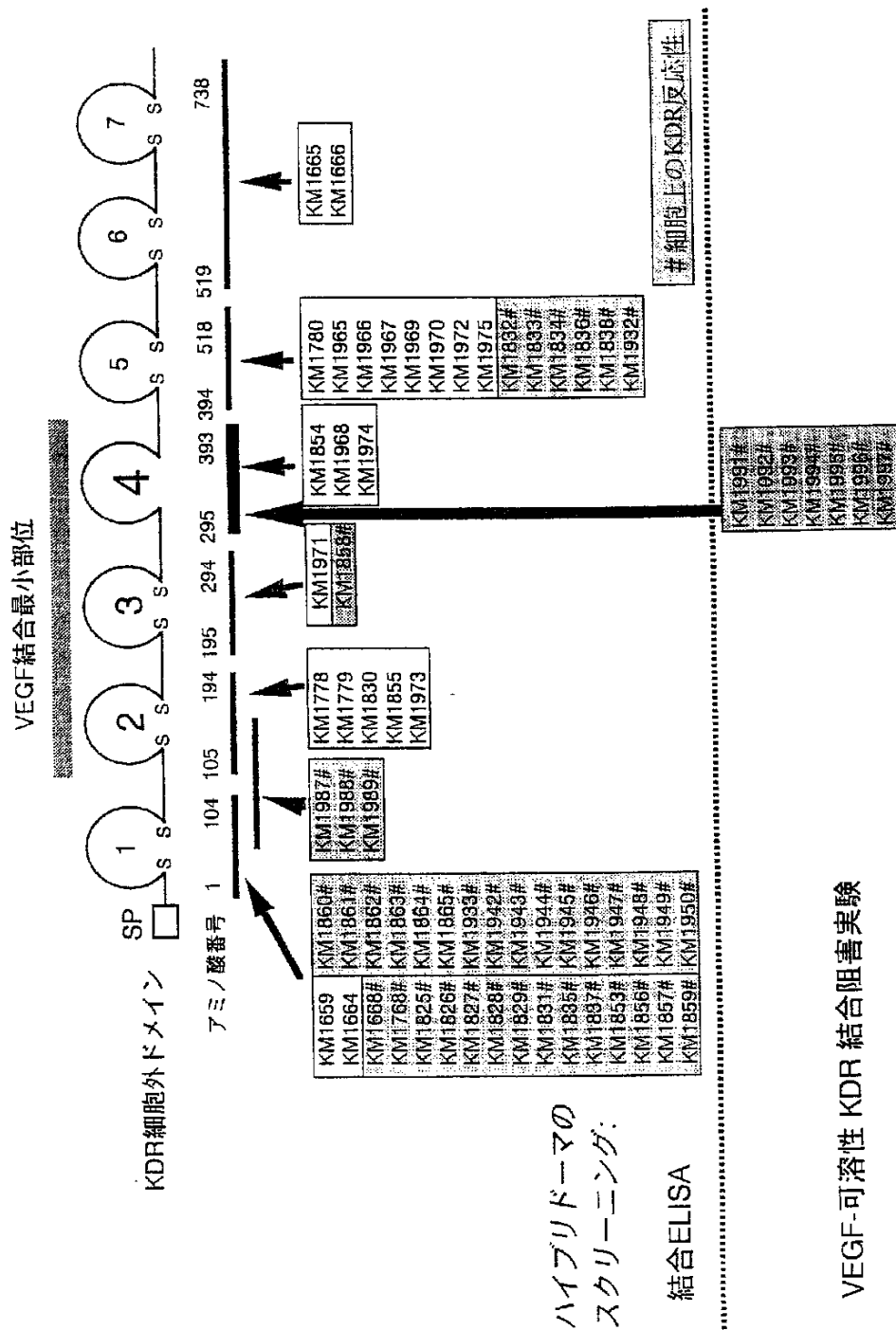
可溶性KDR誘導体のVEGF結合活性

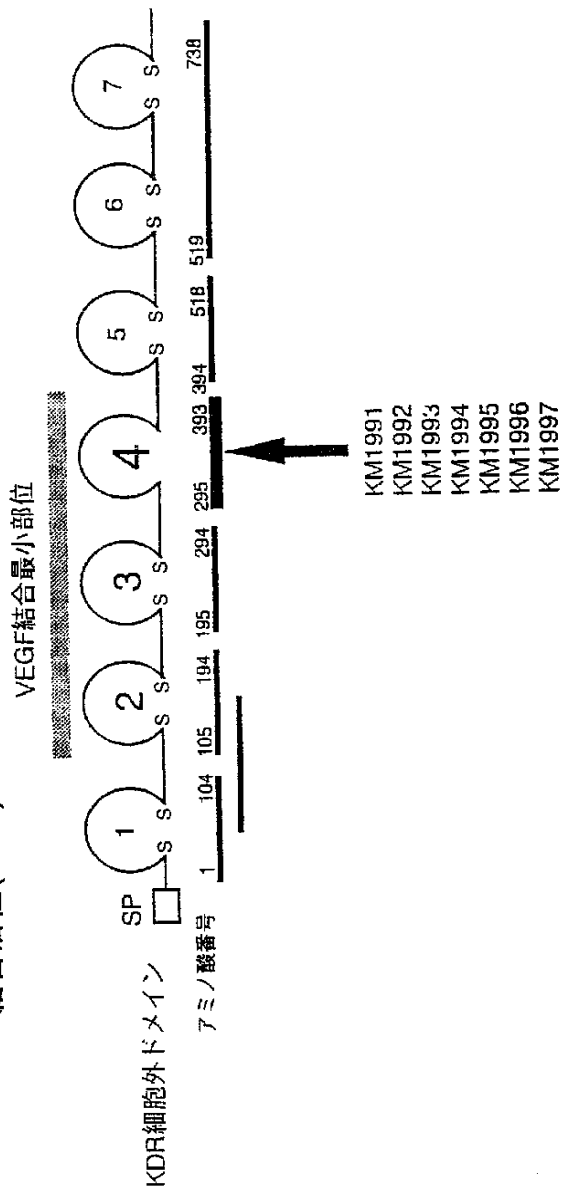
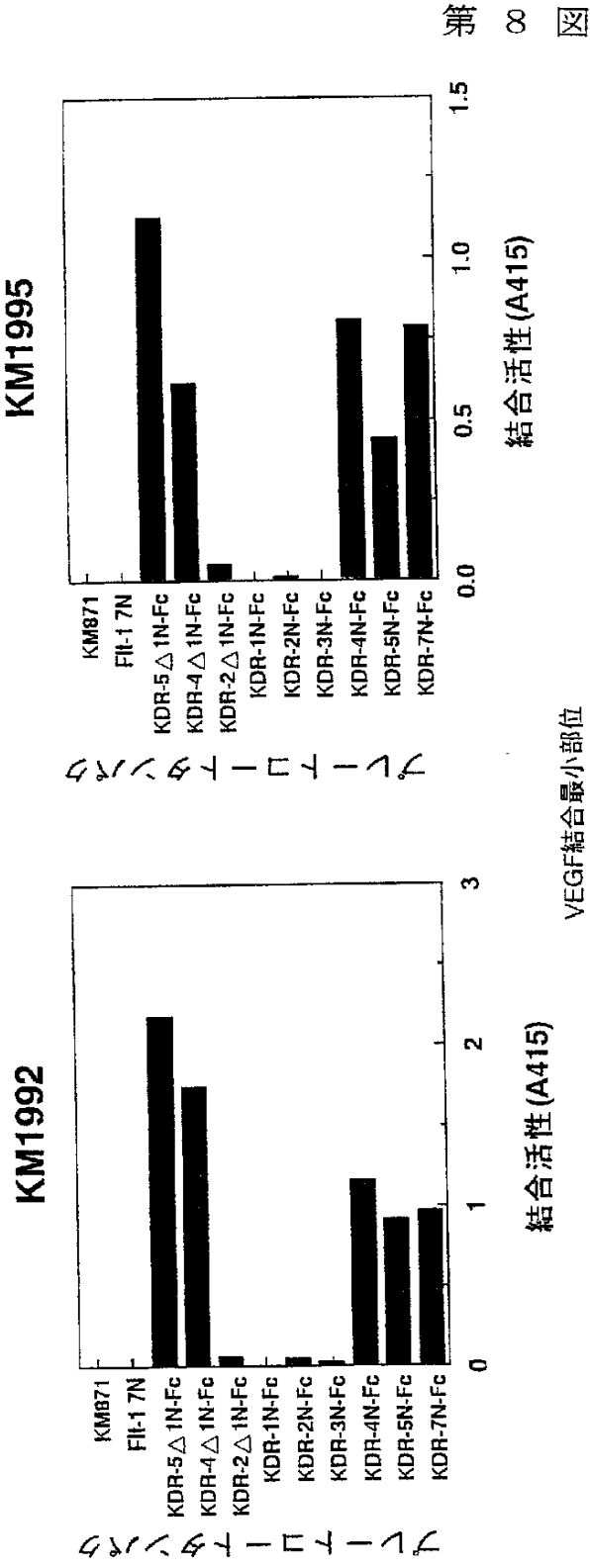


第 6 図



第 7 図

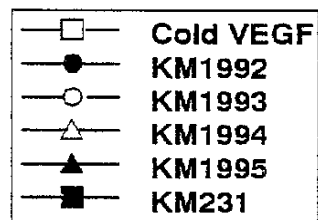
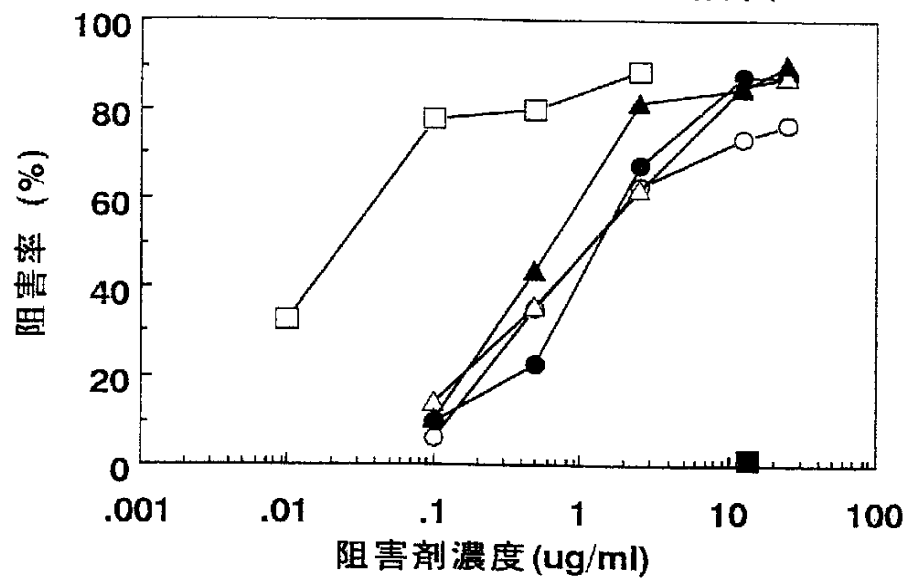




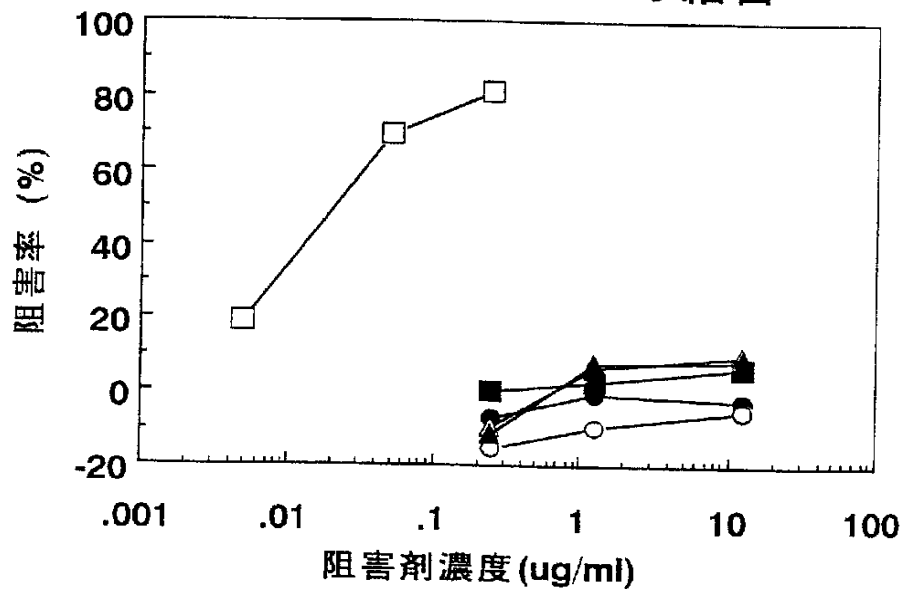


第 9 図

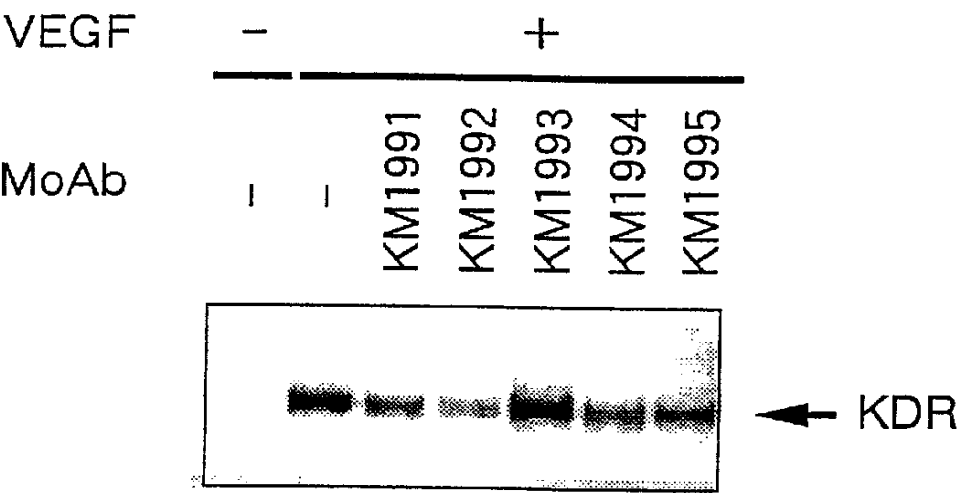
## KDR-7N-FcへのVEGFの結合



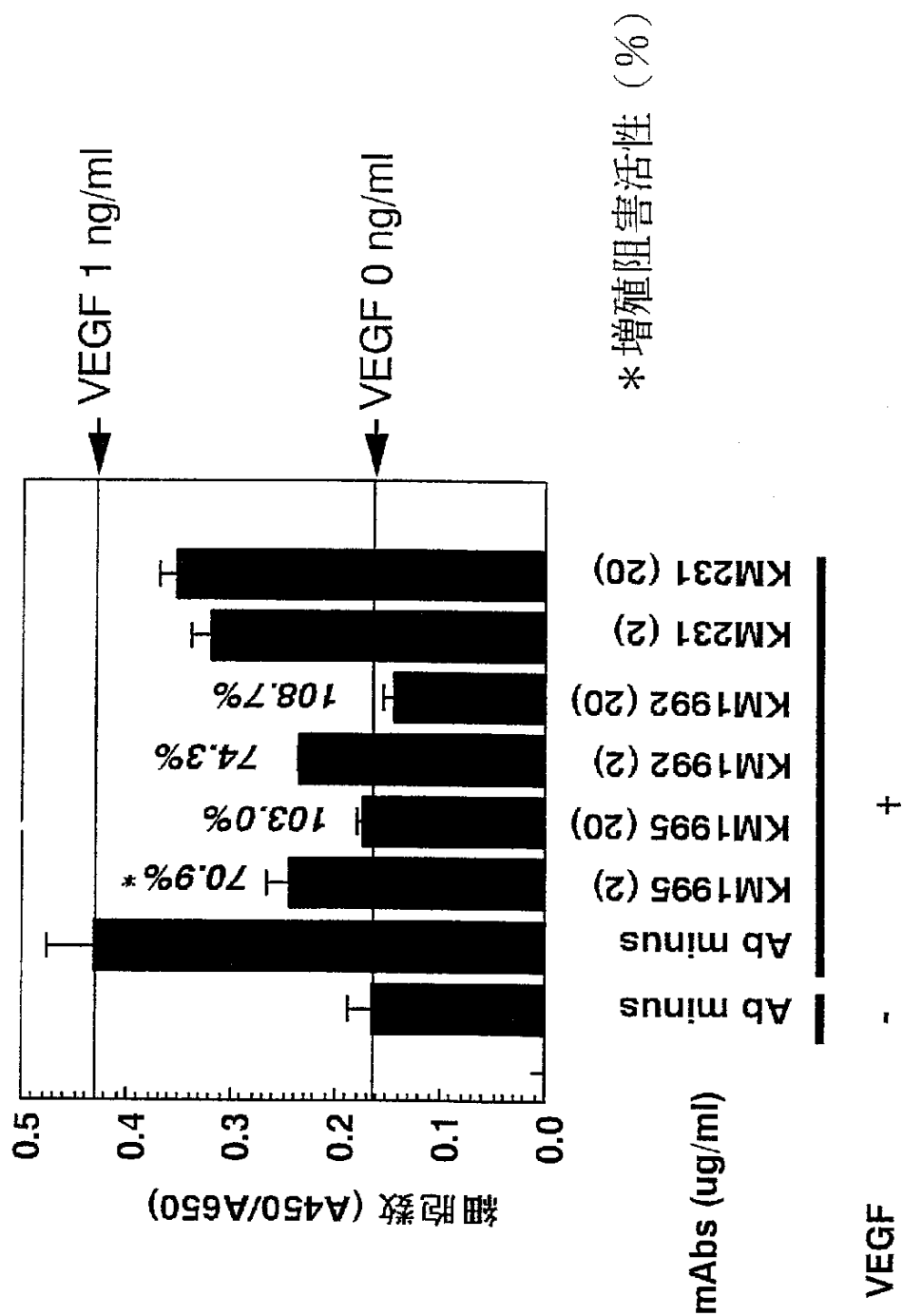
## Flt-1 7NへのVEGFの結合



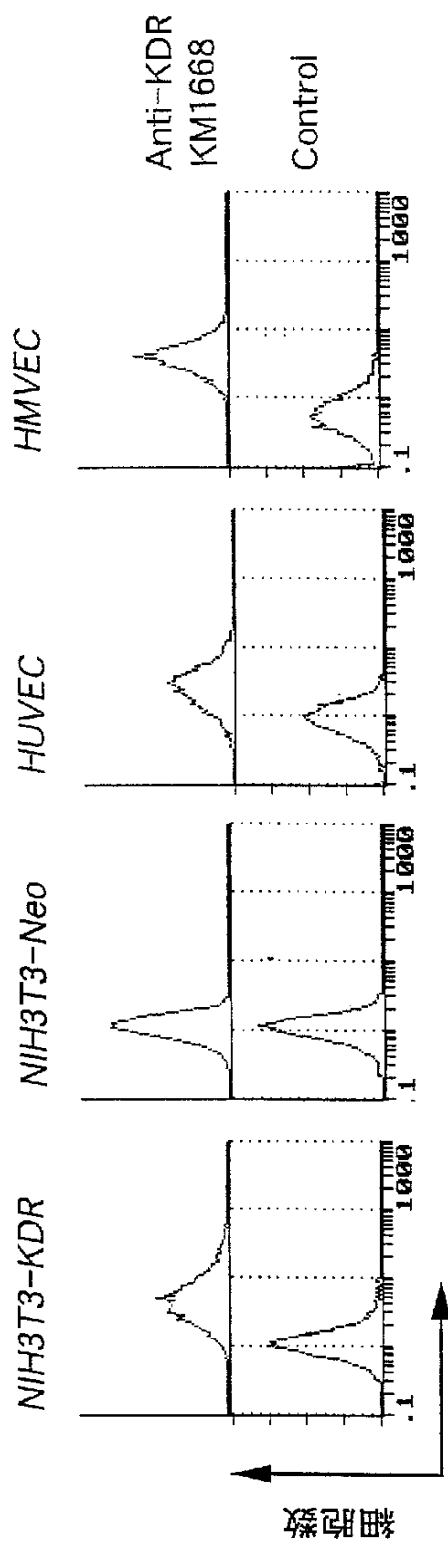
第 10 図



第 11 図

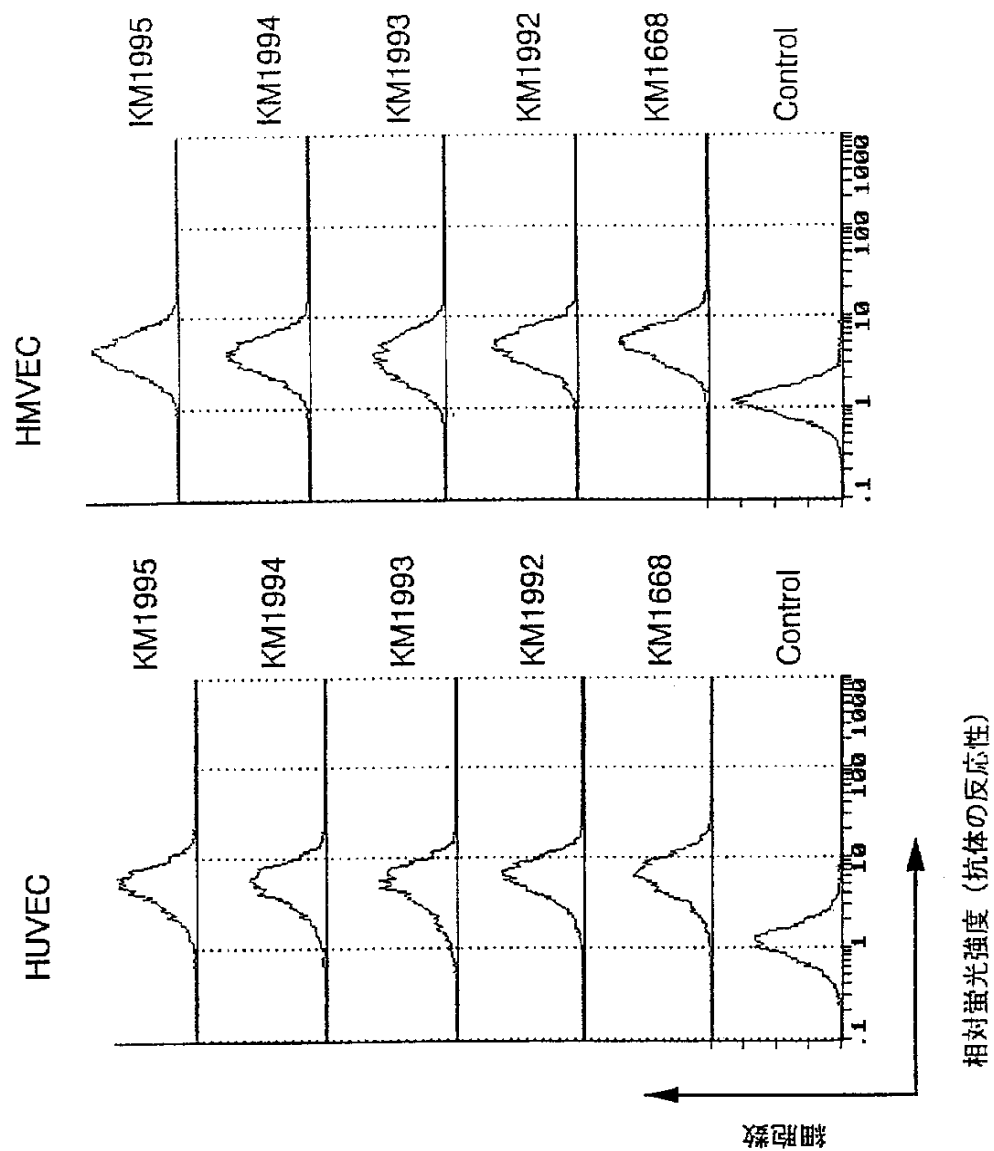


第 12 図



HUVEC: ヒト臍帯静脈血管内皮細胞  
HMVEC: ヒト皮膚毛細血管内皮細胞

第 13 図



## SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<120> Anti human VEGF receptor KDR antibody

<130> 11111

<160> 27

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 1

ctctagag

8

<210> 2

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 2

cagtggttcct ggctgtgcaa aaagtggagg catttttcat aatagaaggt gcctacgtag 60

<210> 3

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 3

gatcctacgt aggcaccctt tattatgaaa aatgcctcca ctlttgcaca gccagaaca 60

ctgcatg

67

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 4

gatcatggag cttagaatg catccttgcg gg

32

<210> 5

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 5

acgctctagg actgttacgt accigaccac gcaatg

36

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 6

aacaaagtcg ggtacgtata atgagc

26

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 7

ggccgctcat tatacgtacc cgactttgtt

30

<210> 8



<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 8

ctgttggaga aaagcttgtc ttaaattg

28

<210> 9

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 9

atacacaacc aggttacc caatggctctg ct

32

<210> 10

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 10

caaggatigt acacctgtgc agcatccagt gggctgtacg tagc

44

<210> 11

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 11

ggccgctacg tacagccac tggaigctgc acaggtgtac aatc

44

<210> 12

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 12

taatgatgaa agttaccagt ctattatgta cgtagc

36

<210> 13

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 13

ggccgctacg tacataatag actggtaact ttcatcat

38

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic DNA

&lt;400&gt; 14

gattcttacgt agc

13

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic DNA

&lt;400&gt; 15

ggccgctacg taa

13

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic DNA

&lt;400&gt; 16

atccccgggta ccttctagag tgcaggt

27

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic DNA

&lt;400&gt; 17

tgccccctgc aagtagatct aagagttgta

30

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic DNA

&lt;400&gt; 18

gtataatgag cggccgcg

18

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic DNA

<400> 19

gatccgcggc cgcctattat ac

22

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 20

ctaattgagcg gccgcgcatg

20

<210> 21

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 21

cgcggccgct cattag

16

<210> 22

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 22

aacaaagtcg ggtacgtata atgagc

26

<210> 23

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 23

ggccgcctcat tatacgtacc cgactttgtt

30

<210> 24

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 24

ctaatgagc

9

<210> 25

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic DNA

&lt;400&gt; 25

ggccgctcat taggtac

17

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 738

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 26

Ala Ser Val Gly Leu Pro Ser Val Ser Leu Asp Leu Pro Arg Leu Ser  
1 5 10 15

Ile Gln Lys Asp Ile Leu Thr Ile Lys Ala Asn Thr Thr Leu Gln Ile  
20 25 30

Thr Cys Arg Gly Gln Arg Asp Leu Asp Trp Leu Trp Pro Asn Asn Gln  
35 40 45

Ser Gly Ser Glu Gln Arg Val Glu Val Thr Glu Cys Ser Asp Gly Leu  
50 55 60

Phe Cys Lys Thr Leu Thr Ile Pro Lys Val Ile Gly Asn Asp Thr Gly  
65 70 75 80

Ala Tyr Lys Cys Phe Tyr Arg Glu Thr Asp Leu Ala Ser Val Ile Tyr  
85 90 95

Val Tyr Val Gln Asp Tyr Arg Ser Pro Phe Ile Ala Ser Val Ser Asp  
100 105 110

Gln His Gly Val Val Tyr Ile Thr Glu Asn Lys Asn Lys Thr Val Val  
 115 120 125

Ile Pro Cys Leu Gly Ser Ile Ser Asn Leu Asn Val Ser Leu Cys Ala  
 130 135 140

Arg Tyr Pro Glu Lys Arg Phe Val Pro Asp Gly Asn Arg Ile Ser Trp  
 145 150 155 160

Asp Ser Lys Lys Gly Phe Thr Ile Pro Ser Tyr Met Ile Ser Tyr Ala  
 165 170 175

Gly Met Val Phe Cys Glu Ala Lys Ile Asn Asp Glu Ser Tyr Gln Ser  
 180 185 190

Ile Met Tyr Ile Val Val Val Val Gly Tyr Arg Ile Tyr Asp Val Val  
 195 200 205

Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val  
 210 215 220

Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn  
 225 230 235 240

Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg  
 245 250 255

Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr  
 260 265 270

Leu Thr Ile Asp Gly Ile Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys  
 275 280 285

Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg  
 290 295 300



Val His Glu Lys Pro Phe Val Ala Phe Gly Ser Gly Met Glu Ser Leu  
305 310 315 320

Val Glu Ala Thr Val Gly Glu Arg Val Arg Ile Pro Ala Lys Tyr Leu  
325 330 335

Gly Tyr Pro Pro Pro Glu Ile Lys Trp Tyr Lys Asn Gly Ile Pro Leu  
340 345 350

Glu Ser Asn His Thr Ile Lys Ala Gly His Val Leu Thr Ile Met Glu  
355 360 365

Val Ser Glu Arg Asp Thr Gly Asn Tyr Thr Val Ile Leu Thr Asn Pro  
370 375 380

Ile Ser Lys Glu Lys Gln Ser His Val Val Ser Leu Val Val Tyr Val  
385 390 395 400

Pro Pro Gln Ile Gly Glu Lys Ser Leu Ile Ser Pro Val Asp Ser Tyr  
405 410 415

Gln Tyr Gly Thr Thr Gln Thr Leu Thr Cys Thr Val Tyr Ala Ile Pro  
420 425 430

Pro Pro His His Ile His Trp Tyr Trp Gln Leu Glu Glu Glu Cys Ala  
435 440 445

Asn Glu Pro Ser Gln Ala Val Ser Val Thr Asn Pro Tyr Pro Cys Glu  
450 455 460

Glu Trp Arg Ser Val Glu Asp Phe Gln Gly Gly Asn Lys Ile Glu Val  
465 470 475 480

Asn Lys Asn Gln Phe Ala Leu Ile Glu Gly Lys Asn Lys Thr Val Ser  
485 490 495

Thr Leu Val Ile Gln Ala Ala Asn Val Ser Ala Leu Tyr Lys Cys Glu  
                   500                                  505                                  510

Ala Val Asn Lys Val Gly Arg Gly Glu Arg Val Ile Ser Phe His Val  
                   515                                  520                                  525

Thr Arg Gly Pro Glu Ile Thr Leu Gln Pro Asp Met Gln Pro Thr Glu  
                   530                                  535                                  540

Gln Glu Ser Val Ser Leu Trp Cys Thr Ala Asp Arg Ser Thr Phe Glu  
 545                                  550                                  555                                  560

Asn Leu Thr Trp Tyr Lys Leu Gly Pro Gln Pro Leu Pro Ile His Val  
                                   565                                  570                                  575

Gly Glu Leu Pro Thr Pro Val Cys Lys Asn Leu Asp Thr Leu Trp Lys  
                   580                                  585                                  590

Leu Asn Ala Thr Met Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asp Ile Leu Ile Met  
                   595                                  600                                  605

Glu Leu Lys Asn Ala Ser Leu Gln Asp Gln Gly Asp Tyr Val Cys Leu  
                   610                                  615                                  620

Ala Gln Asp Arg Lys Thr Lys Lys Arg His Cys Val Val Arg Gln Leu  
 625                                  630                                  635                                  640

Thr Val Leu Glu Arg Val Ala Pro Thr Ile Thr Gly Asn Leu Glu Asn  
                                   645                                  650                                  655

Gln Thr Thr Ser Ile Gly Glu Ser Ile Glu Val Ser Cys Thr Ala Ser  
                   660                                  665                                  670

Gly Asn Pro Pro Pro Gln Ile Met Trp Phe Lys Asp Asn Glu Thr Leu  
                   675                                  680                                  685

Val Glu Asp Ser Gly Ile Val Leu Lys Asp Gly Asn Arg Asn Leu Thr  
690 695 700

Ile Arg Arg Val Arg Lys Glu Asp Glu Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala  
705 710 715 720

Cys Ser Val Leu Gly Cys Ala Lys Val Glu Ala Phe Phe Ile Ile Glu  
725 730 735

Gly Ala  
738

<210> 27

<211> 19

<212> PRT

<213> Human

<400> 27

Met Gln Ser Lys Val Leu Leu Ala Val Ala Leu Trp Leu Cys Val Glu  
1 5 10 15

Thr Arg Ala  
19

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00478

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C07K16/28, 16/46, C12N5/16, 15/06, G01N33/577, A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C07K16/28, 16/46, C12N5/16-5/28, 15/06-15/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Hybridoma, Volume 16, Number 5, issued 1997, Andreas Menrad et al., "Novel Antibodies Directed Against the Extracellular Domain of the Human VEGF-Receptor Type II", pages 465-471	1, 2, 8, 28-32, 36, 37
Y		10-13, 15, 16, 18-20, 23-25
A		3-7, 9, 14, 17, 21, 22, 26, 27, 33
X	Laboratory Investigation, Volume 76, Number 6, issued 1997, Asif Ahmed et al., "Role of VEGF Receptor-1 (Flt-1) in Mediating Calcium-Dependent Nitric Oxide Release and Limiting DNA Synthesis in Human Trophoblast Cells", pages 779-791	1, 2, 8, 28-32, 36
Y	WO, 95/21868, A1 (IMCLONE SYSTEMS INCORPORATED), 17 August, 1995 (17. 08. 95) & EP, 741748, A1 & US, 5840301, A & US, 5874542, A & AU, 9519147, A	10-13, 15, 16, 18-20, 23-25
A		1-9, 14, 17, 21, 22, 26-33, 36, 37

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
30 April, 1999 (30. 04. 99)Date of mailing of the international search report  
18 May, 1999 (18. 05. 99)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00478

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Blood, Volume 92, Number 10, Supplement 1 (Part 1 of 2), issued 15 November 1998, Nikolovska, M.A. et al., "Neutralizing monoclonal antibody to human VEGFR-2(KDR) inhibits Kaposi's sarcoma associated herpes virus (KSHV) induced angiogenesis.", page 704a	1-3, 8, 28-33, 36, 37
PX	WO, 98/11223, A1 (SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT), 19 March, 1998 (19. 03. 98) & DE, 19638745, A1 & AU, 9746222, A & ZA, 9708204, A	1, 2, 8, 28-32, 36, 37
A	JP, 9-509414, A (Ludwig Institute for Cancer Research), 22 September, 1997 (22. 09. 97) & WO, 95/21865, A1 & AU, 9518743, A & EP, 759036, A1	1-33, 36, 37

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00478

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 34, 35

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Invention as set forth in claim 34 falls under the category of methods for diagnosis of the human body, while invention as set forth in claim 35 falls under the category of methods for treatment of the human body by therapy.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest** ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C07K16/28, 16/46, C12N5/16, 15/06, G01N33/577,  
A61K39/395

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C07K16/28, 16/46, C12N5/16-5/28, 15/06-15/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y A	Hybridoma, Volume 16, Number 5, issued 1997, Andreas Menrad et al., "Novel Antibodies Directed Against the Extracellular Domain of the Human VEGF-Receptor Type II", pages 465-471	1, 2, 8, 28-32, 36, 37 10-13, 15, 16, 18-20, 23-25 3-7, 9, 14, 17, 21, 22, 26, 27, 33
X	Laboratory Investigation, Volume 76, Number 6, issued 1997, Asif Ahmed et al., "Role of VEGF Receptor-1(Flt-1) in Mediating Calcium-Dependent Nitric Oxide Release and Limiting DNA Synthesis in Human Trophoblast Cells", pages 779-791	1, 2, 8, 28-32, 36

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30.04.99

国際調査報告の発送日

18.05.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生

印

4N

8214

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	WO, 95/21868, A1 (IMCLONE SYSTEMS INCORPORATED) 17. 8月. 1995 (17. 08. 95) & EP, 741748, A1 & US, 5840301, A & US, 5874542, A & AU, 9519147, A	10-13, 15, 16, 18-20, 23-25 1-9, 14, 17, 21, 22, 26-33, 36, 37
P X	Blood, Volume 92, Number 10, Supplement 1 (Part 1 of 2), is- sued 15 November 1998, Nikolovska, M. A. et al., "Neutralizing monoclonal antibody to human VEGFR-2 (KDR) inhibits Kaposi's sarcoma associated herpes virus (KSHV) induced angiogene- sis.", page 704a	1-3, 8, 28-33, 36, 37
P X	WO, 98/11223, A1 (SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT), 19. 3月. 1998 (19. 03. 98) & DE, 19638745, A1 & AU, 9746222, A & ZA, 9708204, A	1, 2, 8, 28-32, 36, 37
A	JP, 9-509414, A (ルードヴィッヒ・インスティテュート・フオー ・キャンサー・リサーチ) 22. 9月. 1997 (22. 09. 97) & WO, 95/21865, A1 & AU, 9518743, A & EP, 759036, A1	1-33, 36, 37



## 第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 34, 35 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲 34 の発明は、人の身体の診断方法に該当し、請求の範囲 35 の発明は、人の身体の治療による処置方法に該当する。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

## 第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。